

**BESTIMMUNG DES FREIEN HÄMOGLOBINS
IM PLASMA AM SPEKTRALPHOTOMETER BEI
GESUNDEN, AUTOAGGRESSIONSKRANKHEITEN,
MALIGNEN TUMOREN UND CHRONISCHEN
INFEKTEN**

Hannelore Wiesner

1972

Aus der

MEDIZINISCHEN ABTEILUNG des STÄDTISCHEN KRANKENHAUSES LANDSHUT

Direktor: Professor Dr. G. LANDES

BESTIMMUNG DES FREIEN HÄMOGLOBINS IM PLASMA AM
SPEKTRALPHOTOMETER BEI GESUNDEN, AUTOAGGRESSIONSKRANKHEITEN,
MALIGNEN TUMOREN UND CHRONISCHEN INFECTEN.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät

vorgelegt von

HANNELORE WIESNER

aus

Trautenau

1971

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Landes

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Fruhmann

Dekan: Prof. Dr. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 2.12.1972



I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

	Seite
I. <u>EINLEITUNG</u>	1
II. <u>GESTEIGERTE HAEMOLYSE</u> bei	3
1. Autoaggressionskrankheiten	4
2. Malignen Tumoren	6
3. Chronischen Infekten	8
III. <u>METHODEN ZUM NACHWEIS DES PLASMA-HGB AM SPEKTRALPHOTOMETER</u>	9
1. Grundbegriffe in der Spektralphoto- metrie	10
2. Gegenüberstellung der Bestimmung des Hgb im Vollblut und im Plasma	12
a) Überprüfung der klassischen Cyan- methämoglobinmethode auf seine Eignung für die Bestimmung des freien Hgb im Plasma	12
aa) Herstellung eines Cyanmethämo- globinstandards nach ZIJLSTRA und VAN KAMPEN	13
b) Störfaktoren bei der Bestimmung des Hgb im Plasma	15
aa) Plasmafaktor	15
bb) Bilirubinanteil	18
cc) Methämoglobinanteil	19
c) Berücksichtigung des Extinktions- koeffizienten	20
3. Überprüfung einiger Hgb-Derivate im Bezug auf ihre Eignung zur Bestimmung des freien Hgb im Plasma	20
a) Cyanmethämoglobin	20
b) Globin-Hämochromogen	21
c) Pyridin-Hämochromogen	21
d) Oxyhämoglobin (Methode nach SHINOWARA)	22
e) Oxyhämoglobin (Methode nach SCHWERD)	23
f) Carboxyhämoglobin	24
g) Benzidinprobe	24
IV. <u>AUSGEWÄHLTE METHODIK: Hämochromogen- Hämatin-Methode</u>	25

1. Vorzüge	25
2. Fehlerquellen	25
3. Überprüfung auf ihre Genauigkeit	25
a) Vergleich mit der klassischen Cyan- methämoglobin-Methode	27
b) Überprüfung der Differenz 556-580 nm für das Derivat Hämatin	29
c) Vorteile der Differenzmethode	30
4. Notwendige Reagentien und Arbeitsmaterial	32
5. Arbeitsanleitung	33
6. Eichkurve	35
V. <u>ERGEBNISSE</u>	41
1. Normalblute	42
2. Autoaggressionskrankheiten	45
3. Maligne Tumoren	46
4. Chronische Infekte	47
5. Beurteilung der Krankheitsgruppen	48
VI. <u>TABELLEN</u>	50
VII. <u>ABBILDUNGEN</u>	56
VIII. <u>DISKUSSION</u>	65
IX. <u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	72
X. <u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	74

I. EINLEITUNG

=====

Das Hämoglobin besteht bekanntlich aus dem Häm, seinem Farbstoffanteil und dem Globin, einem Eiweißkörper. Das Häm setzt sich aus 4 Pyrrolkernen zusammen, die durch Methinbrücken miteinander verbunden sind und in deren Mitte 2-wertiges Fe eingelagert ist. Das Fe besitzt 6 koordinierte Valenzen, von denen 4 mit den Stickstoffatomen der Pyrrolkerne verbunden sind, während die beiden restlichen für die Bindung des Eiweißkörpers und die reversible Sauerstoffanlagerung verantwortlich sind. Nach HAUROWITZ (1949) ist die sechste koordinierte Valenz des Fe im Hämoglobin mit einem Wasserstoffmolekül besetzt. Im Oxyhämoglobin tritt an seine Stelle der Sauerstoff (H. REIN, M. SCHNEIDER).

Das Hämoglobin besitzt nach Messungen, die mit der Ultrazentrifuge von SVEDBERG und PEDERSEN durchgeführt wurden, ein Molekulargewicht von 68 000, nach neueren Messungen 66 000, nach neuesten Messungen mit der Ultrazentrifuge und mittels osmotischer Druckmessung wurde ein Molekulargewicht von 64 000 ermittelt (G. BRAUNITZER, MÜNCHEN). Auf Empfehlung der "Protein Commission of The International Union of Pure and Applied Chemistry" und vom "National Research Council" übernommen wird das Molekulargewicht mit $4 \cdot 16\,520$ angegeben. 16 520 ist das Molekulargewicht per Gramm Atom von Fe. Der Fe-Gehalt des Hgb wird mit $0.338\% \hat{=} 14.5\text{ g \%} = 100\%$ angegeben (CH. G. DE BOROWICZENY). 96 % des Molekulargewichtes fallen auf den Eiweißkörper, das Globin. Das Hämoglobin setzt sich aus 574 Aminosäuren zusammen. Ein Molekül hat 2 alpha- und 2 beta-Ketten (G. BRAUNITZER).

Die wesentliche Aufgabe des Hämoglobins ist seine Fähigkeit zur reversiblen Sauerstoffaufnahme, der sog. Oxygenierung $\rightarrow$ Oxyhämoglobin ($O_2\text{Hgb}$). Streng davon zu unterscheiden ist die Oxydation. Bei der Oxygenierung bleibt

das Fe zweiwertig, während es bei der Oxydation dreiwertig wird, den Sauerstoff fester bindet und somit für den Sauerstofftransport nicht mehr geeignet ist. Es ist in ein inaktives Derivat, das Methämoglobin, übergegangen (= Hämiglobin = Met-Hb = $\text{Hb} \cdot \text{Fe}^{\text{III}} \cdot \text{OH} = \text{HbOH}$ und H^+ bei saurer Reaktion).

Das reduzierte Hämoglobin ist die sauerstofffreie Form des Blutfarbstoffes = Hgb. Es enthält zweiwertiges Fe. Hämine entstehen nach der Abspaltung des Globins durch Einführung dreiwertigen Fe's an jene beiden N des Porphins, an welchem Wasserstoffe sitzen. Wenn das Fe an der freien Valenz oxydiert ist, so liegt Oxyhäm in vor, früher als Hämatin bezeichnet. Das Häm, die Farbstoffkomponente des Hgb, enthält im Gegensatz zu den Häminen zweiwertiges Fe. Weitere Hämoglobinderivate von mehr toxikologischem Interesse sind das Sulfhämoglobin, das Kohlenmonoxyd-Hämoglobin, das Cyanhämoglobin, das Fluor-Met-Hämoglobin, Stickoxydhämoglobin und das Methylcarbylaminhämoglobin (W. SCHWERD).

In den Erythrozyten liegt das Hgb zu 95 - 96 % in seiner aktiven Form vor (AMUNDSON I), nämlich bivalent. 1 - 5 % liegen inaktiv vor, hauptsächlich als Methämoglobin mit trivalentem Fe-Atom (H. FLEISCH).

Wenn das aktive Hgb im Plasma frei vorliegt, so bildet es einen Komplex mit Haptoglobin, einem α_2 Globulin. In einem normalen Plasma können 100 - 135 mg Oxyhämoglobin pro 100 ml von Haptoglobin gebunden werden. Besteht ein Überschuß an Oxyhämoglobin, so zerfällt es in freie Häm-Gruppen, die sofort oxydiert werden und sich mit Albumin verbinden, um Methämalbumin zu bilden (A. C. ALLISON). Von anderen Autoren wird angegeben, daß das gesamte Hgb-Molekül und nicht das Häm allein die Bindung an die Plasmafraktion eingeht. Häm oder Hämatin soll danach keine derartigen Komplexe bilden (CHI - CHIN LIANG).

Der Hgb-Gehalt des Plasmas wird in der Literatur kaum erwähnt und der Normalwert sehr unterschiedlich angegeben. Die erheblichen Abweichungen dürften durch mehr oder weniger große Fehlerquellen in der Anwendung verschiedener Methoden bedingt sein. Auf die Schwierigkeiten einer exakten Methodik werden wir noch ausführlicher eingehen.

Nach SHINOWARA enthält Normalserum, mit der Benzidinmethode bestimmt, 1,4 - 2,7 mg Hgb pro 100 ml. Von HAM wurde 5 mg Hgb pro 100 ml als die oberste Grenze gefunden, von CROSBY und DAMASHEK mit der Modifikation von BING und BAKER 4 mg. Über die Hämochromogenmethode erhielten FLINK und WATSON und auch FLEISCH Werte bis zu 7,5 mg pro 100 ml. Der höchste Wert wird mit 20 mg pro 100 ml von SCHULTEN angegeben, der niederste Wert findet sich bei HANKS et al. (1960), der mit einer modifizierten Benzidinmethode Werte zwischen 0,160 und 0,580 mg pro 100 ml fand.

II. GESTEIGERTE HAEMOLYSE =====

Ist das Plasma-Hgb erhöht, das bei der Zerstörung der Erythrozyten freigesetzt wird, so kann auf das Vorliegen eines hämolytischen Prozesses geschlossen werden, bzw. auf eine Verkürzung der normalen Erythrozyten-Überlebenszeit. Sie beträgt 100 - 120 Tage (CROSBY, 1956) und wurde mit Cr₅₁ markierten Erythrozyten ermittelt. Noch genauere Ergebnisse bringt die Methode mit DFP₃₂ (= di - iso - pro - pyl - fluoro - phosphanate) von DIEZ - EWALD und LAYRISSE (1965). Durch sie werden auch ganz geringe Verkürzungen der Erythrozyten-Überlebenszeit erfaßt, wenn sie mit Cr₅₁ noch normal ausfällt. Eine weitere Methode für die Bestimmung der Erythrozyten-Überlebenszeit ist der Differential - Agglutinationstest nach ASHBY.

Der physiologische Untergang der Erythrozyten wird bestimmt durch den Verbrauch der Enzymsysteme, die den Metabolismus der Erythrozyten regulieren, durch Verlangsamung des Blutstromes und seine Stauung in gewissen Organen, vor allem in der Milz und durch weitere bekannte und unbekannte Mechanismen. Eine erhöhte Hämolyse ist eine Krankheiterscheinung; sie bedingt das "hämolytische Syndrom" oder die "hämolytische Anämie". Es wurde berechnet, daß eine hämolytische Anämie besteht, wenn die mittlere Lebensdauer der Erythrozyten weniger als 15 Tage beträgt (LAWKOWITZ, 1965). Auch ohne Vorhandensein einer Bilirubinämie, die gewöhnlich als metabolische Zwischenstufe bei der Hämolyse auftritt, jedoch abhängig von der Leistungsfähigkeit der Leber ist, und ohne Auftreten einer Anämie (diese ist die Resultante aus der Intensität der Hämolyse und der Kompensationsfähigkeit des blutbildenden Systems) kann eine Hämolyse bestehen, die dann als "latente Hämolyse" oder als "Syndrom der verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten" bezeichnet wird (LAWKOWITZ). Die Ursachen für die Hämolyse können angeboren oder erworben sein. Bei den angeborenen handelt es sich um morphologische als auch um biochemische Störungen, bei der Sphärozytose z. B. wird ein Enolase-Mangel ursächlich angeschuldigt. Den erworbenen hämolytischen Anämien liegen extracelluläre Faktoren zugrunde, wie tox. Einflüsse, physikalische Ursachen, Infekte, Allergien und Immunitätsmechanismen.

1. Hämolytische Anämien bei Autoaggressionskrankheiten

Die durch Immunitätsmechanismen bedingten hämolytischen Anämien haben in jüngster Zeit besonderes Interesse gewonnen. Sie gehören in die Gruppe der Autoaggressionskrankheiten und werden durch Autoantikörper ausgelöst.

Der Begriff Autoantikörper wurde 1907 von WEIL und BRAUN für die Antikörper der Wassermann-Reaktion geprägt. Bei der Autoallergie ist gleichzeitig mit dem Reaktionsträger (= Autoantikörper oder Autoimmunzelle) stets auch sein Reaktionspartner (die autogene Reaktionskomponente des Organismus) vorhanden. Erneute Zufuhr des Antigens zur Reaktionsauslösung, wie es bei den allergischen Phänomenen notwendig ist, muß hier nicht vorliegen (STEFFEN, 1968). Als Ursache der Alteration von autogenem Material kommen verschiedene Einflüsse in Frage: physikalische, chemische oder enzymatische Einwirkungen, Einflüsse allgemein entzündlicher oder infektiös-toxischer Genese.

Gegen Erythrozyten gerichtete Antikörper gehören zu 65 % in die Gruppe der inkompletten Wärme-Antikörper, seltener sind die kompletten Wärme-Antikörper und nur 6 % machen die kompletten und inkompletten Kälte-Antikörper aus (LAWKOWITZ, 1965).

Die Beladung der Erythrozyten mit inkompletten Wärme-Antikörpern wurde von LOUITT und MALLISON bei erworbenen hämolytischen Anämien festgestellt. Die autoimmunisierenden hämolytischen Anämien treten selten idiopathisch auf, häufig treten die Symptome jedoch sekundär im Anschluß an eine primär ablaufende Erkrankung auf. So kann es im Rahmen einer gesicherten Autoaggressionskrankheit, wie Lupus erythematosus, Periarteriitis nodosa, primär chronischer Polyarthrit, chronischer Hepatitis u. a., zu einer Autoimmunisierung gegen Erythrozyten kommen. Es kann aber auch im Laufe eines Virusinfektes, eines bakteriellen oder Protozoen-Infektes, wie auch bei neoplastischen, lympho- und myeloproliferierenden Prozessen sekundär zu einer Autoimmunisierung gegenüber Erythrozyten kommen.

Bei den Autoaggressionskrankheiten sind die Antikörper gegen bestimmte körpereigene Zellen oder Gewebe gerichtet, wie z. B. gegen das Kollagen bei den Kollagenosen. Die Autoantikörper können aber wahrscheinlich unter gewissen Umständen einen größeren Wirkungsbereich annectieren und dabei auch die Erythrozyten angreifen.

Andererseits kann sich im Laufe eines entzündlichen oder pathologisch proliferierenden Prozesses mit der Ausbildung abartiger Proteine und Plasmaproteine eine autoimmunologische hämolytische Anämie einstellen ohne daß bis jetzt eine Autoaggression gegenüber anderen körpereigenen Substanzen beobachtet werden konnte.

Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Erythrozyten wird in der Regel mit dem direkten oder indirekten Coombstest erbracht (eine Modifikation ist der Supercoombstest). Ein breiteres Spektrum und die Möglichkeit der Differenzierung kommt dem Antiglobulinkonsumptionstest von STEFFEN zu. Sicherer als der Coombstest ist auch die Agglutinationsprobe bei mit Trypsin und Papain vorbehandelten Erythrozyten, die sogar in Remissionsperioden positiv ist. Bei manchen hämolytischen Anämien ist die direkte und indirekte Kolloidreaktion positiv.

Die serologischen Reaktionen können aber von Fall zu Fall und bei ein und demselben Kranken je nach Krankheitsstadium verschieden ausfallen. Bei akuten Fällen sind die serologischen Reaktionen oft negativ. Auch lassen sich bei sicher erworbenen hämolytischen Anämien, wie z. B. im Laufe einer chronisch lymphatischen Leukämie, keine Antikörper nachweisen, so daß der Mechanismus der serologischen Reaktion schwer vorzustellen ist (STEFFEN, 1968).

2. Hämolytische Anämien bei malignen Tumoren

Die Anämie als solche ist ein häufiges Symptom bei malignen Tumoren und Hämoblastosen. Ihre Ursache kann sehr unterschiedlich sein. Prof. PRIBILLA (1969) schlägt eine Unterteilung in "Anämie bei Tumor" mit einer leicht erkennbaren Ursache und in die eigentliche "Tumoranämie" vor.

Zu den Anämien bei Tumor zählen die Blutungsanämien, die aplastischen Anämien, die megaloblastischen Anämien und hämolytische Anämien.

Unter den eigentlichen Tumoranämien versteht man eine meist normochrome Anämie mit einer Änderung im Eisenstoffwechsel. Es liegt eine Verminderung des Serumeisenspiegels und zum Unterschied gegenüber den Eisenmangelanämien und den sideroachrestischen Anämien eine Eisenspeicherung in den Retikulumzellen vor. Gleichzeitig ist die Erythrozyten-Lebensdauer mäßig verkürzt. Es liegt also auch eine hämolytische Komponente vor. Es ist möglich, daß die Verkürzung der Erythrozyten-Lebensdauer durch bestimmte, aber noch nicht identifizierte, vom Tumor produzierte Substanzen hervorgerufen wird, die auf die Erythrozyten schädigend wirken. Auffallend ist bei dieser Art der hämolytischen Anämie, daß das Knochenmark die ihm eigene Steigerungsfähigkeit der Produktion auf den durch die leichte Hämolysen bedingten Erythrozytenzerfall nicht in Anspruch nimmt. Das freiwerdende Eisen bleibt überwiegend in den Retikulumzellen liegen. Das Knochenmark reagiert jedoch positiv auf die Stimulierung mit Erythropoetin. Ob diese Tatsache nun die Folge einer verminderten Erythropoetinproduktion ist oder ob vom Tumor produzierte Erythropoetin-Inhibitoren eine Rolle spielen, ist noch nicht geklärt.

Neben dieser Form der leichten Hämolysen bei "Tumoranämie" mit genau definierten Kriterien kann es bei Tumor auch zu hämolytischen Anämien anderer Ursache kommen. Es kann zu ausgeprägten Hämolysen bei den verschiedensten Carcinomen kommen, deren Ursache durchwegs noch unklar ist. Der Coombs-test ist bei solchen Patienten mit Carcinomen oder Lymphogranulomatose meist negativ, bei malignen Lymphomen, chron. lymphatischer Leukämie und Ovarialtumoren oft positiv. Es gibt die verschiedensten Hypothesen hierüber. Autoantikörper spielen offenbar nur bei einem Teil eine Rolle, ausgelöst vielleicht durch Gewebszerstörung infolge des Tumorstoffwechsels, durch entzündliche Reaktionen oder Stoffwechselprodukte des Tumors. Es könnte auch eine Stimulierung des RES mit gesteigerter Phagozytose einen beschleunigten Erythrozytenabbau hervorrufen. Auch lokale Blutungen könnten ein pathogenetischer Faktor für eine vorzeitige Zerstörung

von Erythrozyten sein, ebenso eine Änderung der Erythrozytenstruktur mit einer Minderung der Zellvitalität durch den Kontakt mit dem Tumor. Bei Knochenmarksmetastasierung treten die Tumorzellen vielleicht im Bezug auf notwendige Bausteine mit den Erythrozyten in Konkurrenz, so daß minderwertige Erythrozyten gebildet werden. Vermutlich wird der pathogenetische Mechanismus nicht für alle Fälle gleich sein. Im Rahmen der Krebsforschung hat heute auch die Krebsimmunologie an Bedeutung gewonnen (SCHNEEWEISS, 1969).

3. Hämolytische Anämien bei chron. Infekten

Infektionen bilden eine häufige Anämienursache. Unter den Anämien auf infektiöser Basis wurde bislang nur einer kleinen Gruppe ausgeprägter hämolytischer Charakter zuerkannt, z. B. bei Virusinfektionen, Infektionen mit Colibakterien, Malaria, Toxoplasmose usw. Die hämolytischen Anämien weisen auch serologische Eigentümlichkeiten auf. Auch hier ist der Mechanismus der serologischen Reaktionen schwer vorzustellen. Es sind sowohl akute als auch chronische Fälle solcher Anämien bekannt, bei denen keine gegen die Erythrozyten gerichteten Antikörper festgestellt werden konnten (LAWKOWITZ, 1965).

Die Infektanämien zählen in die Gruppe der Eisenmangelanämien, sind aber gegen Eisentherapie refraktär. Wie bei den Tumoranämien wandert das freiwerdende und zugeführte Fe in das RES und an den Ort der Entzündung ab (PRIBILLA, 1969). Studien von HEILMEYER und WOEHLE mit radioaktivem Eisen ergaben, daß sich das Eisen nicht nur im RES, sondern auch in einer breiten Zone um den Entzündungsherd anlagert. Spätere Untersuchungen zeigten, daß das aus den Milzzellen gewonnene Hämosiderin fähig ist, die verschiedensten Bakterientoxine und die beim Gewebszerfall entstehenden Toxine total zu entgiften.

Auch bei der Infektanämie kommt es durch Erythropoetin zu einer Stimulierung des Knochenmarks, so daß derselbe Mechanismus wie bei den malignen Tumoren angenommen werden muß.

Ebenfalls wird bei ihnen eine leichte Hämolyse, bzw. eine geringe Verkürzung der Erythrozytenlebenszeit beobachtet (HEILMEYER, PRIBILLA, LAWKOWITZ, LAYRISSE).

HEILMEYER weist auch auf einen primär schädigenden Einfluß des Infektes auf die Erythrozyten und Störungen in der Synthese des Blutfarbstoffes hin.

DIEZ EWALD und LAYRISSE demonstrierten 1965 mit DFP₃₂ markierten Erythrozyten, daß bei Eisenmangelanämien mit zusätzlichem Infekt (sie wählten die Hakenwurminfektion) die Erythrozyten-Überlebenszeit verkürzt ist gegenüber Eisenmangelanämien allein, z. B. einer Blutungsanämie. Es wird angenommen, daß die Hämolyse bei Infekt-Anämien durch einen Intrinsic-Mangel der Erythrozyten zustande kommt.

Auch die Genese der Hämolyse bei Infektanämien scheint vielseitig zu sein. Es überschneiden und beeinflussen sich auto-immune, metabolische und strukturelle Mechanismen.

III. METHODEN ZUM NACHWEIS DES PLASMA-HÄMOGLOBINS =====

AM SPEKTRALPHOTOMETER =====

Als empfindlichster qualitativer und quantitativer Nachweis des Hämoglobins und seiner Derivate kann das spektralphotometrische Verfahren betrachtet werden.

HOPPE und SEYLER ist die Entdeckung des 2-bandigen Oxyhämoglobinspektrums im Jahre 1862 zuzuschreiben. VIERORDT stellte 1873 die erste Absorptionskurve des Oxyhämoglobins auf.

Das Oxyhämoglobin-Spektrum zählt heute zu den best erforschten Farbstoffspektren (siehe Abb. 1). Die beiden Maxima bei 576 nm und 540 nm sind scharf begrenzt. Dazwischen liegt das Minimum bei 560 nm. Bei 414 nm liegt ein weiteres steiles Maximum, das erst 1878 von SORÉT entdeckt wurde und das alle Hämoglobin-Derivate mit intaktem Tetrapyrrolring zeigen.

Im Ultraviolett folgen dann noch weitere kleine Bande bei 343 nm und bei 275 nm. Bei 275 nm zeigen alle zyklischen Aminosäuren ein Absorptionsmaximum.

Das Spektrum des reduzierten Hgb wurde 1865 von STROKE entdeckt. Das Maximum I liegt bei 555,3 nm, also in der Mitte zwischen den beiden Maxima von Oxyhämoglobin, das II. Maximum bei 428,3 nm und das Minimum bei 480 nm.

Das Spektrum des Methämoglobin liegt in strenger Abhängigkeit von der H-Jonen Konzentration. Zur Bestimmung von Methämoglobin neben Oxyhämoglobin bei beliebigem Ph wird der Spektralbereich 623 nm gewählt, da hier das Methämoglobin unabhängig von der sauren oder alkalischen Reaktion stets den selben Extinktionskoeffizienten aufweist.

Das Cyanmethämoglobin hat ein Maximum bei 540 nm, im Bereich der Sorètbande bei 412 bis 416 nm. Sulfhämoglobin zeigt bei 617 nm ein scharfes Maximum.

1. Grundbegriffe in der Spektralphotometrie

Ein wichtiger Begriff in der Spektralphotometrie ist der Extinktionskoeffizient. Jeder Farbstoff hat einen ihm eigenen spezifischen Extinktionskoeffizienten k . Der Extinktionskoeffizient einer gefärbten Lösung ist der negative Logarithmus der durch 1 cm Schicht durchgelassenen Lichtmenge in Bruchteilen einfallenden Lichtes gemessen (HEILMEYER, 1933). Der Extinktionskoeffizient ϵ ist die Extinktion bezogen auf die Einheit der Schichtdicke. Er ist der einfachste Ausdruck für die relative Konzentration eines Farbstoffes. Der spezifische Extinktionskoeffizient k ist der Extinktionskoeffizient bezogen auf die Einheit der Konzentration.

Das Verhältnis der bei 2 verschiedenen Wellenlängen, aber bei derselben Konzentration und Schichtdicke gemessenen Extinktionen ist für ein und denselben Farbstoff eine Konstante, die nur von der Natur des Farbstoffes und des Lösungsmittels abhängt.

$$E_1 = k_1 \cdot c \cdot d$$

$$E_2 = k_2 \cdot c \cdot d$$

$$\frac{E_1}{E_2} = \frac{k_1}{k_2} \quad \text{d. h.,}$$

das Verhältnis der bei 2 verschiedenen Wellenlängen gemessenen Extinktion ist gleich dem Verhältnis der spezifischen Extinktionskoeffizienten.

Am sichersten wird ein Farbstoff definiert, wenn man die Lichtabsorption in zahlreichen, etwa 15 - 20 Wellenlängen über das ganze Spektrum hin bestimmt = quantitative Aufzeichnung des Absorptionsspektrums.

Die Lichtabsorption wird auf der Ordinate, die Wellenlänge auf der Abszisse angegeben.

Drei verschiedene Arten der Darstellung siehe Abb. 2, 3, 4.

Bei der Berechnung der Hämoglobinkonzentration wird der molare Extinktionskoeffizient des jeweiligen Hämoglobin-derivates eingesetzt, sowie das Molekulargewicht des Hämoglobins. Berücksichtigt wird die Verdünnung des Blutes bzw. der Hämoglobin-Lösung (HEILMEYER, 1933).

Beispiel:

$$\begin{aligned} & \frac{E_{\text{Probe}} \cdot 16114}{11,0 \cdot 10^{-3}} \cdot 0,1 \cdot \frac{2,510}{0,010} \\ &= \frac{E_{\text{Probe}} \cdot 1,6114 \cdot 251}{11,0} = \text{g \% Hgb} \end{aligned}$$

2. Gegenüberstellung der Bestimmung des Hgb im Vollblut und im Plasma

Die für die Bestimmung des Hgb im Vollblut angewandten Methoden sind nicht empfindlich genug für die Bestimmung des Hgb im Plasma. Für Plasma-Hgb wird eine Genauigkeit bis zu 0,1 mg pro 100 ml verlangt. Für die Bestimmung des Hgb im Plasma muß eine sehr exakte Abnahmetechnik gefordert werden um eine Hämolyse auszuschließen.

Trübungen und andere im Blut vorkommende Farbstoffe, die bei der Hgb-Bestimmung im Vollblut vernachlässigt werden können, sind bei dem niedrigen Hgb-Gehalt im Plasma beachtliche Störfaktoren.

a) Zur Bestimmung des Hgb im Vollblut wird heute allgemein die Cyanmethämoglobin-Methode empfohlen, für die kommerzielle Standarde zur Verfügung stehen. Das Cyanmethämoglobin-Pigment wurde bereits 1935 von David DRABKIN empfohlen und noch heute verwendet man das "Drabkin-Reagens". Das Cyanmethämoglobin hat bemerkenswerte Vorzüge, die es als Standard vor allen anderen Hgb-Derivaten auszeichnen.

1. Lösungen dieses Pigments sind über Jahre haltbar. Gegenwärtig wird jedoch die Verfallszeit mit 9 Monaten angegeben.
2. Alle Hgb-Derivate, außer Sulfhämoglobin, das ohne praktische Bedeutung ist, werden in Cyanmethämoglobin übergeführt.
3. Das Absorptionsband bei 540 nm ist sowohl breit als auch scharf.

Industrielle Standarde sind lieferbar (Fa. Merck/Darmstadt und Fa. Asid/München) von ca. 80 - 24 mg Cyanmethämoglobin/100 ml, entsprechend einer 251fachen verdünnten Blutlösung. Sie enthalten somit 20 g bis 6 g Hgb pro 100 ml. Für die Bestimmung des Hgb im Plasma müßten Standarde zur Verfügung stehen, die weniger als 100 mg Hgb entsprechen. Wir stellten einen eigenen Standard her, um

eine größere Konzentrationsbreite und Variabilität des Standards zu erhalten, in der Hoffnung, diese Methode auch für die Bestimmung des Plasma-Hgb variieren zu können. Wir wandten die Methode nach ZIJLSTRA und VAN KAMPEN (1962) an, die im wesentlichen der Methode nach CROSBY und HOUCHIN (1957) gleicht.

aa) Herstellung eines Cyanmethämoglobinstandards nach
ZIJLSTRA und VAN KAMPEN

1. Frisches Spenderblut, vorsichtig aufgezogen in einer mit Liquimin durchgespülten Spritze, wird bei 3000 Touren zentrifugiert und das Plasma abgesaugt.
2. Die Zellen werden 2 mal mit 0,9 %iger NaCl-Lösung gewaschen, d. h. jeweils bei 3000 Touren 10 Minuten lang zentrifugiert und jeweils der Überstand abgesaugt.
3. Nach Zugabe von 1,2 %iger NaCl-Lösung wird vorsichtig in einem graduierten Reagensglas gemischt, bei 3000 Touren zentrifugiert und der Überstand abgesaugt und verworfen. Denselben Vorgang wiederholt man noch einmal.
4. Die gleiche Menge von Aqua dest. wird zugefügt und 0,4 Volumen Toluol. Die Mischung wird sorgfältig geschüttelt und für 12 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt.
5. Zentrifugieren bei etwa 10 000 Touren (höchste Tourenzahl). Es haben sich drei Schichten getrennt. Die oberste Schicht besteht aus Toluol und wird abgesaugt, der letzte Rest des Toluols mit einer feinen Metallpipette. Die unterste Schicht ist Hämoglobininlösung und wird von der kompakten Mittelschicht vorsichtig abgegossen.
6. Filtrieren mit einem kohlenfreien Filter → reine Hämoglobininlösung (2fach verdünnt).
7. Herstellung eines Standards: z. B. 0,2 ml Hgb Lösung und 15 ml Drabkin-Reagens $\hat{=}$ 76 · 2facher Verdünnung.
8. Beliebige Verdünnung in einen gut meßbaren Bereich: z. B. 0,2 ml der Lösung von Punkt 7 und 5 ml Drabkin-

Reagens $\hat{=}$ 26facher Verdünnung der Hgb-Lösung von Punkt 7.

9. Einfüllen der Lösung von Punkt 8 in eine Cuvette und Ablesen der Extinktion an der Skala des Spektralphotometers (als Leerwert wird Drabkin-Reagens verwendet).

$$E = 0,058 \text{ (im Mittel bei 9 Messungen)}$$

10. Berechnung der Hgb-Konzentration nach dem Dreisatz

$$E \ 0,44 \text{ bei } 1 \text{ cm Schichtdicke } \hat{=} 645 \text{ mg Hgb/l}$$

$$E \ 0,001 \text{ bei } 1 \text{ cm Schichtdicke } \hat{=} 1,465 \text{ mg Hgb/l}$$

$$\begin{aligned} E \ 0,058 \text{ bei } 1 \text{ cm Schichtdicke } &\hat{=} 1,465 \text{ mg Hgb/l} \cdot 58 \\ &= 84,970 \text{ mg Hgb/l} \end{aligned}$$

11. Berechnung der Hgb-Konzentration der unverdünnten Hgb-Lösung in g %:

$$84,970 \text{ mg Hgb/l} \cdot \text{Verdünnung}$$

$$= 84,970 \text{ mg Hgb/l} \cdot 2 \cdot 76 \cdot 26$$

$$= 335,801 \text{ g Hgb/l}$$

$$= 33,58 \text{ g \% Hgb/l}$$

Der Hgb-Gehalt (MCHC = mean corpuscular haemoglobin content) liegt bei 35 % (KLEIN-WIESENBERG).

Über die selbsthergestellte Hgb-Lösung können beliebige Standarde bestimmt werden.

Bei dem Versuch, die Cyanmethämoglobin-Methode, die für die Hgb-Bestimmung im Vollblut die Methode der Wahl ist, auf die Bestimmung des Hgb im Plasma anzuwenden, stießen wir auf folgende Schwierigkeiten:

Bei der Bestimmung des Hgb im Vollblut wählt man gewöhnlich eine Blutverdünnung von 251, so daß die Konzentration des Verdünnungs-Reagens (Drabkin-Reagens) nahezu 100 % beträgt. Bei der Bestimmung des Hgb im Plasma kann man dieses nur wenig verdünnen, um überhaupt eine meßbare Extinktion zu erhalten, bei einem Hgb-Gehalt von 5 mg % etwa 2 - 3fach.

Somit wird der Reagens-Anteil bei der Bestimmung prozentual stark vermindert.

Auch bei gleicher Verdünnung des Reagens in der Vergleichskuvette wie bei der Plasma-Hgb-Probe (bei der Bestimmung des Hgb im Vollblut mißt man gegen reines Drabkin-Reagens in der Vergleichskuvette) erhielten wir im Bereich um 420 nm ($\hat{=}$ Sorétbande) eine negative Extinktion und keinen Gipfel bei 540 nm ($\hat{=}$ Maximum für Oxyhämoglobin), obwohl alle Hämoglobinderivate mit intaktem Tetrapyrrolring als auch das Ferricyanid der Reaktionslösung ein Maximum bei 420 nm zeigen (s. Abb. 5 und 6).

Zu erklären ist dies damit, daß Ferricyanid in der Probekuvette durch oxydierende Substanzen in Ferrocyanid umgewandelt wird, welches bei einer niedrigeren Wellenlänge ein Maximum aufweist. Die Extinktion des Inhaltes der Probekuvette zeigt somit bei ca. 420 nm einen niedrigeren Ausschlag und es resultiert eine scheinbar negative Extinktion. Zu umgehen ist diese Tatsache dadurch, daß man entweder ein anderes geeignetes Oxydationsmittel wählt, wie z. B. Kaliumnitrit oder indem man zu der mit 0,9 %iger NaCl-Lösung verdünnten Plasmaprobe 1 Tropfen 20 %ige Kaliumferricyanidlösung und 1 Tropfen 10 %ige KCN-Lösung zufügt, wie es FLEISCH vorschlägt.

b) Störfaktoren bei der Bestimmung des Hgb im Plasma

aa) Plasmafaktor

Bei der Bestimmung des Hgb im Plasma weist das Plasma durch seinen hohen prozentualen Anteil eine beachtliche Eigenabsorption auf. Es galt somit, den Plasmafaktor auszuschalten oder zu umgehen. Der Versuch, das Plasma zu enteiweißen, mußte fehlschlagen, da das Hämoglobin selbst einen Eiweißanteil besitzt. Ebenso kann es zu keinem Ergebnis führen, wenn man in die Vergleichskuvette denselben Anteil von Plasma gibt, der der Verdünnung der Probelösung entspricht, da jedes

Plasma Spuren von Hämoglobin enthält und somit kein Leerwert erhalten wird.

Zu diskutieren wäre eine Methode, bei der bei identischem Plasma sowohl das Hgb in der Probelösung als auch das in der Vergleichslösung in ein jeweils verschiedenes Derivat übergeführt würde, die Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge gemessen und die Differenz bestimmt würde. Da jedoch die verschiedenen Hgb-Derivate gleicher Konzentration bei jeder Wellenlänge eine verschieden hohe Extinktion anzeigen, erhält man auch auf diese Weise nicht die wahre Extinktion des Plasmas. Selbst im Bereich der Sorébande, die jedes Hgb-Derivat mit einem steilen Gipfel anzeigt, liegen die Maxima nicht identisch, sondern verteilen sich zwischen 380 und 450 nm, so daß der Gipfel des einen Hgb-Derivates das Spektrum des anderen möglicherweise an einem steilen Teil der Kurve schneidet. Einen sehr wertvollen Hinweis für die Ausschaltung des Plasmafaktors fanden wir bei FLEISCH in einer Abwandlung über "Mesure de l'hémolyse par la détermination dans le plasma de l'hémoglobine, la méthémoglobine et leurs dérivés". Er stellte fest, daß sich bei Hämatin (entsteht durch Zusatz von NaOH zu Hgb) die Extinktion zwischen 556 und 580 nm fast nicht ändert, daß also die Differenz der Extinktion zwischen diesen beiden Wellenlängen fast allein dem Plasma zuzuschreiben ist.

Wir überprüften diese Aussage bei einer aus kristallisiertem Rinder-Hgb hergestellten Lösung.

200 mg Hgb in einem 100 ml Kolben bis zur Eichmarke mit Aqua dest. aufgefüllt entspricht einer 200 mg %igen wässrigen Hgb-Lösung.

Hämatinbildung bei 4facher Verdünnung:

2 ml Hgb-Lösung + 6 ml 10 %ige NaOH-Lösung

$$E_{556} = 0,268 \quad 0,268 \quad 0,263 \quad 0,257 \quad 0,257$$

$$E_{580} = 0,262 \quad 0,262 \quad 0,253 \quad 0,252 \quad 0,251$$

$$\text{Diff} = 0,006 \quad 0,006 \quad 0,010 \quad 0,005 \quad 0,006$$

mittlere Differenz ist 0,006

Wandelt man das Hgb im Plasma durch Hinzufügen von 10%iger NaOH + Natriumdithionit in Hämochromogen um, mißt die Extinktionsdifferenz zwischen 560 und 580 nm und zieht davon die Extinktionsdifferenz der Hämatinlösung bei diesen beiden Wellenlängen ab, so erhält man die wahre Hämochromogen-Extinktion.

Will man die eigentliche Plasmaextinktion feststellen, so muß man noch ein drittes Derivat bilden, z. B. Cyanmethämoglobin. Man mißt in diesem Fall die Extinktion bei 540 nm (Maximum für Cyanmethämoglobin) und bei 665 nm (Minimum für Cyanmethämoglobin) und bestimmt die Differenz (durch die Differenzmethode sollen die Trübungsfaktoren, die in jeder Plasmalösung mehr oder weniger vorliegen, zum größten Teil ausgeschaltet werden, s. Seite 28).

Die Extinktionsdifferenz schließt nun die Hgb-Extinktion + Plasmaextinktion ein. Da die Hgb-Konzentration bereits als Hämochromogen errechnet wurde, kann man daraus die Extinktion für Cyanmethämoglobin bei bekannter Konzentration ausrechnen und diese Extinktion von der Differenz 540 - 665 nm abziehen, so daß man nun die wahre Plasmaextinktion erhält.

Leider ist es nicht möglich, diesen Faktor generell abzuziehen, da er einer zu großen Spanne unterliegt. Während FLEISCH von einem Durchschnittswert von 0,060 bei 14 verschiedenen Bluten berichtet, fanden wir einen Wert von 0,056 bis 0,089 bei 15 verschiedenen Proben in jeweils 4facher Verdünnung und einen Mittelwert von 0,075. Aus diesem Grunde ist es nicht möglich, die Hgb-Konzentration im Plasma mittels eines einzigen Derivates zu bestimmen.

bb) Bilirubinanteil

Zu untersuchen wäre noch der Einfluß des Bilirubins auf die Hgb-Konzentration, das vor allem bei den Versuchsreihen der chronischen Hepatitiden in größerer Quantität auftritt. Hämochromogen zeigt bei 556 nm ein Maximum, bei 580 nm ein Minimum, dazwischen liegt ein steiler Abfall. Für Bilirubin liegt das Maximum bei 450 nm, zwischen 556 und 580 nm zeigt es einen flachen Abfall bei niedrigerer Extinktion (s. Abb. 7). Bilirubin hat somit nur einen geringen Einfluß auf die Differenz zwischen 556 nm und 580 nm, bei größerer Quantität wird es die Differenz für Hämochromogen gering vermindern und damit auch die Hgb-Konzentration (s. Abb. 7 und 8).

Einen stärkeren Einfluß hat Bilirubin z. B. bei Messungen im Bereich der Sorétbande wie bei der Oxyhämoglobin-Methode nach SCHWERD (Messung bei 415 nm nahe dem Maximum für Bilirubin) oder bei der Oxyhämoglobin-Methode nach SHINOWARA, bei welcher die Differenz 576 - 560 nm gemessen wird. Da zwischen 576 und 560 nm für Oxyhämoglobin ein Abfall besteht, während Bilirubin in diesem Wellenlängenbereich einen Anstieg zeigt, muß bei einer größeren Bilirubinkonzentration die Extinktionsdifferenz für Hgb stärker vermindert werden (s. Abb. 7 und 1).

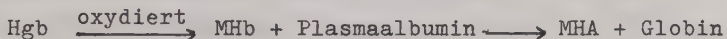
Wir glauben, den Einfluß des Bilirubins bei unserer Methodik vernachlässigen zu können, da er nur gering ist. Wollte man ihn berücksichtigen, müßte der Extinktionskoeffizient für Bilirubin für die Differenz 556 - 580 nm in plasmatischen Lösungen (für wässrige Lösungen möglicherweise nicht identisch) experimentell bestimmt werden.

Zu der bekannten Bilirubin-Konzentration eines normalen Plasmas wäre reines Bilirubin bekannter Konzentration zuzufügen und wiederum unter Berücksichtigung des Plasmafaktors und des freien Hgb, das im gewünschten

Bereich eine stärkere Absorption als Bilirubin aufweist, die Extinktionsdifferenz zu bestimmen. Somit müßte man zuerst die Hgb-Konzentration bestimmen, die bereits durch den physiologischen Bilirubingehalt des Plasmas gering verfälscht ist. Es dürfte sehr schwer sein, einen exakten Extinktionskoeffizienten für Bilirubin zu erhalten. Wir glauben, daß seine Bestimmung den Rahmen unserer Arbeit sprengen würde.

cc) Methämoglobin-Anteil

Frei im Plasma vorliegendes Hgb wandelt sich spontan in sein inaktives Derivat Methämoglobin um, wenn es 100 mg % übersteigt. Methämoglobin wandelt sich in Gegenwart von Plasma-Albumin in Methämalbumin + Globin um.



Für die Bestimmung des freien Hgb im Plasma muß deshalb einer Methode der Vorzug gegeben werden, die sowohl Methämalbumin, als auch Hgb und seine Derivate quantitativ erfaßt.

Methämalbumin ist ein Komplex zwischen Hämatin und Plasma-Albumin (s. Seite 2) und wurde 1938 von FAIRLEY beschrieben. Es heißt nach ihm auch "Fairley-Pigment". Das Eisen liegt im MHA in oxydiertem und trivalentem Zustand vor, es ist somit ein inaktives Derivat und kann O_2 nicht transportieren. FAIRLEY maß es durch den Test von SCHUMM. Dabei wird die Wellenlänge von 403 nm gewählt. Die Methode ist aber nicht anwendbar bei Hämolyse, da HbO_2 und die Mehrzahl seiner Derivate ebenfalls eine sehr starke Absorption bei 403 nm zeigen. FAIRLEY und seinen Mitarbeitern gelang es, eine Absorptionskurve für MHA ohne Einfluß des Plasmas aufzustellen.

c) Berücksichtigung des Extinktionskoeffizienten

Nicht alle Hgb-Derivate haben in wässriger und plasmatischer Lösung denselben Extinktionskoeffizienten. Die bekannten Extinktionskoeffizienten der einzelnen Derivate sind alle auf wässrige Lösungen bezogen, da sie bei der Bestimmung im Vollblut einer erheblichen Verdünnung unterliegen. Will man das freie Hgb im Plasma bestimmen, so müssen die Extinktionskoeffizienten neu bestimmt werden.

3. Überprüfung einiger Hgb-Derivate im Bezug auf ihre Eignung zur Bestimmung des freien Hgb im Plasma

a) Cyanmethämoglobin: (Methode nach FLEISCH)

Die klassische Cyanmethämoglobinmethode mit dem Drabkin-Reagens ist für die Bestimmung des Hgb im Vollblut die Methode der Wahl. Will man diese Methode anwenden, darf man nicht die übliche Lösung nach Drabkin anwenden, da die Konzentration der Reaktiva dann zu schwach wird. Nach H. FLEISCH werden der nur schwach verdünnten plasmatischen Lösung 1 gtt. Kaliumferricyanid (20 %ig) und 1 gtt. KCN (10 %ig) zugefügt. Auch größere Mengen der Reaktiva stören nicht. Die Reaktiva selbst beeinflussen das Absorptionsspektrum erst unter 500 nm. Ferricyanid muß ohne Lichteinfall und im Kühlschrank aufbewahrt werden. Abgelesen wird 5 Minuten nach Zufügen der Reaktiva bei 540 und 665 nm. Nach Berechnen der Differenz muß der Plasmafaktor nach der auf Seite 16 beschriebenen Methodik abgezogen werden. Durch Zufall ist der Extinktionskoeffizient von Cyanmethämoglobin (CiHb) und Cyanmethämalbumin (MHACN) bei 540 bis 665 nm fast gleich (11,2). Auch plasmatische Extinktionen liegen auf einer Geraden und folgen somit dem Gesetz von BEER-LAMBERT. CiHb und MHACN werden mit der gleichen Extinktion quantitativ erfaßt.

b) Globin - Hämochromogen: (Methode nach HUNTER, GROVE-RASMUSSEN und SOUTTER)

z. B. 1 ml Plasma + 3 ml 10 %ige NaOH + kleine Menge Natriumdithionit — → Hämochromogen.

Gemessen wird nach 10 Minuten bei 556 und 580 nm (Absorptionsmaximum bei 556 nm). Nach 10 Minuten kommt es zum Maximum der Absorption, diese bleibt 2 Stunden lang stabil. NaOH und Natriumdithionit sind gleichzeitig zuzugeben. Läßt man erst das NaOH einwirken, so werden die Extinktionen für wässrige Lösungen zu nieder, für plasmatische zu hoch.

Für wässrige Lösungen beträgt der Extinktionskoeffizient 16,1 für 1g %

Für plasmatische nicht verdünnte Lösungen beträgt er 17,5 für 1g %

Umrechnung des Extinktionskoeffizienten von 1g % in den Extinktionskoeffizienten für 1 mMol pro l:

E für 1 mMol pro l = E für 1g % • 16 520 : 10 000
für wässrige Lösung: E = 26,6
für plasmatische Lösung: E = 28,9

Es werden HbO₂, reduziertes Hgb, MHb und HbS in Hämochromogen übergeführt. Auch Methämalbumin wird gut in Albumin-Hämochromogen übergeführt, besitzt aber eine um 20 % höhere Spitze als Hämochromogen (spielt erst ab 100 mg % eine Rolle). Der Extinktionskoeffizient ist deshalb zu niedrig für Albumin-Hämochromogen, bzw. das Ergebnis zu hoch (s. Abb. 9).

c) Pyridin - Hämochromogen: (Methode nach FLINK und WATSON)

Dieses Pigment besteht aus reduziertem Hämatin, denaturiertem Globin und Pyridin.

Nach Abwandlung von FLEISCH:

1 ml Probe + 8,5 ml 10 %iges Ammoniak + 0,5 ml Pyridin
+ ca. 0,2 g Natriumhydrosulfit

Die optische Dichte wird nach 10 Minuten bei 556 und

580 nm abgelesen, indem man gegen Aqua dest. bei diesen beiden Wellenlängen mißt. Das Pigment hat hier eine maximale Absorption und eine sehr schwache Absorption. Die Differenz wird wie üblich bestimmt.

Die Absorption in wässriger Lösung nimmt in der ersten Minute sehr schnell ab, dann langsamer. Für plasmatische Lösung nimmt sie konstant ab. Deshalb ist es schwierig, einen Extinktionskoeffizienten für dieses Pigment festzustellen.

Für wässrige Lösung beträgt der Ext.Koeff. 11,8 für 1g % (dieser Wert ist sehr variabel. Hier wurde er 10 Minuten nach Zugabe der Reaktiva bestimmt.)

Für plasmatische Lösung beträgt der Ext.Koeff. 17,7 für 1g %
bei wässriger Lösung : E für 1 mMol / l = 19,4
bei plasmatischer Lösung: E für 1 mMol / l = 29,2

Bei dieser Methode sind Oxyhämoglobin, reduziertes Hgb, Kohlenoxydhämoglobin, Sulfhämoglobin, Methämoglobin und Hämatin quantitativ verwandelt in Pyridin-Hämochromogen. MHA wird gut umgewandelt. Das Maximum der Absorption liegt wieder bei 556 nm, die übrige Kurve ist der von Hämochromogen sehr ähnlich. Auf jeden Fall liegt die Spitze von Pyridin-Albumin-Hämochromogen bei 556 nm um 50 % höher als von Pyridin-Hämochromogen (spielt ebenfalls erst ab 100 mg % Hgb eine Rolle). Außerdem besteht eine Ungenauigkeit in der Messung durch die mangelnde Stabilität des Pigments (s. Abb. 10).

d) Oxyhämoglobin: (Methode nach SHINOWARA)

1 ml Probelösung + 3 ml 0,9 %ige NaCl 1 Minute schütteln → vollständige Sättigung

Gemessen wird bei 576 und 560 nm und die Differenz bestimmt.

Es besteht hier der gleiche Extinktionskoeffizient für wässrige und plasmatische Lösungen.

$E_{576 - 560 \text{ nm}} = 4,27$ für 1g % Lösung

Jedoch werden bei dieser Methode nicht die inaktiven Pigmente, wie MHA, gemessen, ebensowenig die Pigmente, die in kleinen Mengen zusätzlich entstehen, wie red. Hgb, LENFANT

hat bei 505 nm gemessen. Hier besteht dieselbe Absorption für HbO_2 und für red. Hgb, jedoch kommt es in diesem Bereich auch schon zu einer beträchtlichen Absorption für Plasma und Bilirubin.

e) Oxyhämoglobin: (Methode nach SCHWERD)

Bei dieser Methode wird im Bereich der Sorétbande gemessen.

1 ml Plasma + 10 ml 0,01 %ige Sodalösung

(bei Werten unter 5 mg wählt man eine Verdünnung von 1 : 6)

Messung der Absorption bei 415, 380 und 450 nm

$$\frac{(2 D_{415} - D_{380} + D_{450})}{1,655} \cdot \frac{\text{Verdünnung} \cdot 1000}{E}$$

$$= \text{mg Hgb} / 100 \text{ ml}$$

E wurde mit 79,46 ermittelt. Die Mitbestimmung der optischen Dichte bei 380 und 450 nm geschieht zur Ausschaltung des Trübungsfehlers entsprechend der Formel von RIMINGTON und SVEINSSON. Das BEER'sche Gesetz soll bis zu einer Konzentration von 140 mg HbO_2 (Verdünnung 1:11) gelten.

Ungenauigkeiten entstehen, wenn andere Farbstoffe vorliegen, wie Met'Hb oder Hämatin. Dies kann durch die Bestimmung des Quotienten D_{420}/D_{414} festgestellt werden, wobei die Absorption des COHgb bei 420 nm zur Bildung eines Hilfsquotienten herangezogen wird.

$$\frac{D_{\text{HbO}_2 420}}{D_{\text{HbO}_2 414}} = 0,94$$

$$\frac{D_{\text{HbCO}_{420}}}{D_{\text{HbO}_2 414}} = 1,52$$

Bei Trübungen ist noch jeweils der Faktor A zu substrahieren, der folgendermaßen berechnet wird.

$$A = D_{415} - \frac{2 D_{415} - (D_{380} + D_{450})}{1,655}$$

Ikterische Seren sind für diese Methode nicht geeignet, da das Absorptionsmaximum für Bilirubin bei 450 nm liegt. Auch wird MHA nicht erfaßt und die Plasmaextinktion wird hier nicht berücksichtigt.

f) Carboxyhämoglobin: (Methode nach MONTEGNANY)

Das Hgb wird in HbCO übergeführt, nachdem es zuvor mit Natriumdithionit reduziert wurde. Es wird hier die Differenz zwischen 568 und 680 nm bestimmt. CO bindet sich sehr leicht an Hgb. Nach der Zugabe von Natriumdithionit entsteht jedoch oft eine Trübung, die die Messung ungenau macht. Carboxyhämalbumin hätte jedoch eine ähnliche Absorptionskurve wie HbCO.

g) Benzidinprobe: (Methode nach CREDITOR)

Bei dieser Methode wird die Aktivität der Pseudoperoxydase von Hgb mittels Benzidin gemessen.

1/4 verd. Plasma + 2 ml 2 %iges Benzidin aufgelöst in
20 %iger Essigsäure + 1 ml 1,5 %iges H_2O_2

Der Wasserstoff darf nicht vor dem Benzidin zugegeben werden, da er die Pseudoperoxydase - Aktivität zerstört. Nachdem das Gemisch von Plasma und Benzidin eine Stunde stehengelassen wurde, fügt man die 20 %ige Essigsäure auf 100 ml zu. Gemessen wird 30 Minuten später bei 490 nm. Nach FLEISCH wird bei 510 und 680 nm gemessen und die Differenz berechnet.

$E_{510 - 680 \text{ nm}} = 5500$ für 1g % bei wässriger Lösung

$E_{510 - 680 \text{ nm}} = 4700$ für 1g % bei plasmatischer Lösung
MHA reagiert ebenfalls, jedoch gibt es eine viel niedrigere Extinktion als Hgb.

IV. Ausgewählte Methodik: HÄMOCHROMOGEN-HÄMATIN-METHODE =====

Wir wählten diese Methode, weil sie die Kriterien der Genauigkeit erfüllt, einfach zu handhaben ist und somit für Routinezwecke geeignet ist.

1. Vorzüge:

- a) Die wesentlichen Hgb-Derivate, wie HbO_2 , red. Hgb und HbS werden gut in Hämochromogen übergeführt.
- b) Auch Methämalbumin wird in Albumin-Hämochromogen übergeführt.
- c) Hämochromogen zeigt einen steilen Gipfel bei 556 und ist somit gut für die Differenzmethode geeignet.
- d) Hämochromogen zeigt das Maximum der Absorption nach 10 Minuten und bleibt 2 Stunden stabil. Dies genügt den Anforderungen auf Genauigkeit.
- e) Bilirubin, dem neben Hgb der größte Farbstoffanteil im Plasma zukommt, zeigt bei den Wellenlängen 556 bis 580 eine nur geringe Absorption und einen flachen Abfall des Absorptionsspektrums, so daß es am ehesten bei dieser Methode vernachlässigt werden kann.
- f) Für die Bildung von Hämatin, welches für die Berechnung des Plasmafaktors nötig ist, braucht man kein zusätzliches Reagens.

2. Fehlerquellen:

- a) Ein Ungenauigkeitsfaktor liegt in der bereits erwähnten Tatsache, daß Albumin-Hämochromogen eine um 20 % höhere Absorptionsspitze zeigt als Hämochromogen, der erhaltene Extinktionskoeffizient damit zu niedrig bzw. die Konzentration von Hgb zu hoch erhalten wird. Bei unseren ausgewählten Fällen überstieg der Hgb-Gehalt allerdings nicht die 100 mg % - Grenze, sodaß dieser Ungenauigkeitsfaktor bei unserer Arbeit entfällt. Allein bei der Überführung in Cyanmethämoglobin zeigen Cyanmethämoglobin und Cyanmethämalbumin

dieselbe Extinktion, bei allen übrigen Pigmenten differieren die beiden Größen.

- b) Ein weiterer Nachteil dieser Methodik liegt darin, daß der Extinktionskoeffizient für plasmatische Lösungen nicht mit dem für wässrige Lösungen übereinstimmt. Er kann aber jeweils aus dem Verdünnungsverhältnis errechnet werden. Wir wählten bei unseren Versuchsreihen das konstante Verdünnungsverhältnis 1 : 4 und erhielten stets meßbare Extinktionen (dieses Verdünnungsverhältnis kann bei einer Hgb-Konzentration von 0 - 140 mg % beibehalten werden).
- c) Es wäre von Vorteil, wenn man eine geeignete Vergleichslösung ansetzen könnte. Die beschriebenen Methoden halten einer Kritik auf Genauigkeit jedoch nicht stand. Wir bildeten versuchsweise Pyridinhämochromogen, mußten aber eine Abweichung bis zu 50 % in Kauf nehmen. Am geeignetsten ist die Bildung von Cyanmethämoglobin, wobei man von der erhaltenen Extinktion den mittleren Plasmafaktor abzieht.
- d) Aus der Abweichung der in der Literatur angegebenen Normalwerte für Plasma-Hgb ist zu ersehen, daß die einzelnen Methoden stark voneinander abweichen und daß es schwierig ist, bei so niederen Konzentrationen genaue Meßwerte zu erhalten. Ein wesentlicher Genauigkeitsfaktor liegt in der Abnahmetechnik zur Vermeidung einer Hämolyse.

Wir möchten ausdrücklich darauf hinweisen, daß es uns aufgrund obiger Kriterien nicht möglich war, den Absolutwert für Plasma-Hgb zu erhalten. Es kam uns lediglich darauf an, einen brauchbaren Bezugswert für unsere ausgewählten pathologischen Plasmen zu finden. Außerdem legten wir auf eine im Routinebetrieb durchführbare und doch möglichst genaue Methodik wert. Diesen Anforderungen wird die Hämochromogen-Methode gerecht.

3. Überprüfung der Hämochromogen-Methode auf ihre Genauigkeit:

- a) Im Vergleich mit der Cyanmethämoglobin-Methode (klassische Drabkin-Methode und abgewandelte Methode nach FLEISCH zur Bestimmung des Plasma-Hgb):

Herstellung einer 200 %igen Hgb-Lösung aus kristallisiertem Rinder-Hgb der Firma Serva /Heidelberg:

Wir verwendeten einen sterilen 100 ml Kolben und lösten das Hgb in Aqua dest. unter Auffüllung des Kolbens bis zur Eichmarke auf. Jede Messung wurde mindestens fünfmal hintereinander durchgeführt und der Mittelwert der Extinktion eingesetzt.

- aa) Überführen der 200 %igen Hgb-Lösung mittels Drabkin-Reagens in Cyanmethämoglobin bei 51-facher Verdünnung:

0,1 ml Hgb-Lösung + 5 ml Drabkin-R.

$E_{540} = 0,027 \quad 0,027 \quad 0,027 \quad 0,027 \quad 0,028 \quad 0,028$

Berechnung nach der Formel:

$$\frac{E \cdot 1,65 \cdot \text{Verdünnung}}{\text{Ext. Koeff.}} = g / 100 \text{ ml}$$

Es wurde das Molekulargewicht von Hgb mit 16 520 eingesetzt.

$$\frac{1,65 \cdot 0,027 \cdot 51}{11,2} = 0,19759 \text{ g / 100 ml}$$
$$= 198,59 \text{ mg \% Hgb}$$

Die Abweichung von der bekannten 200 %igen Hgb-Lösung beträgt 1,21 %.

- bb) Überführen der 200 %igen Hgb-Lösung in Hämochromogen bei 8-facher Verdünnung:

0,5 ml Hgb-L. + 5 ml 10 %ige NaOH + Natriumdithionit

$E_{556} = 0,441 \quad 0,444 \quad 0,442 \quad 0,442 \quad 0,443 \quad 0,442 \quad 0,443$

$E_{580} = 0,047 \quad 0,049 \quad 0,046 \quad 0,046 \quad 0,047 \quad 0,044 \quad 0,046$

$\text{Diff.} = 0,394 \quad 0,395 \quad 0,396 \quad 0,396 \quad 0,396 \quad 0,398 \quad 0,397$

mittlere Diff. = 0,396

Berechnung nach obiger Formel:

$$\frac{1,65 \cdot 0,396 \cdot 8}{26,6} = 0,196511 \text{ g / 100 ml}$$
$$= 196,511 \text{ mg \% Hgb}$$

Mit 26,6 wurde der Hämochromogen-Ext. Koeff. für wässrige Lösungen eingesetzt.

Die Abweichung von der bekannten Hgb-Lösung beträgt 1,75 %.

- cc) Überführen der 200 %igen Hgb-Lösung in Cyanmethämoglobin nach der Differenz-Methode bei 11-facher Verdünnung:

0,5 ml Hgb-Lösg. + 5 ml Aqua dest. + 1 gtt. KCN
+ 1 gtt. FeKCN

$$E_{540} = 0,255 \quad 0,253 \quad 0,254 \quad 0,254 \quad 0,255$$

$$E_{665} = 0,136 \quad 0,132 \quad 0,133 \quad 0,134 \quad 0,133$$

$$\text{Diff.} = 0,119 \quad 0,121 \quad 0,121 \quad 0,120 \quad 0,122$$

$$\text{mittlere Diff.} = 0,121$$

Berechnung nach obiger Formel:

$$\frac{1,65 \cdot 0,121 \cdot 11}{11,2} = 0,19608 \text{ g / 100 ml}$$
$$= 196,08 \text{ mg \% Hgb}$$

Die Abweichung von der bekannten Hgb-Lösung beträgt 1,96 %.

- dd) Überführen der 200 %igen Hgb-Lösung in Hämochromogen bei 4-facher Verdünnung:

0,5 ml Hgb-L. + 1,5 ml 10 %ige NaOH + Natriumdithionit

$$E_{556} = 0,912 \quad 0,913 \quad 0,913 \quad 0,914 \quad 0,914$$

$$E_{580} = 0,113 \quad 0,113 \quad 0,112 \quad 0,113 \quad 0,111$$

$$\text{Diff.} = 0,799 \quad 0,800 \quad 0,801 \quad 0,801 \quad 0,803$$

$$\text{mittlere Diff.} = 0,801$$

Berechnung nach obiger Formel:

$$\frac{1,65 \cdot 0,801 \cdot 4}{26,6} = 0,19874 \text{ g / 100 ml}$$
$$= 198,74 \text{ mg \% Hgb}$$

Die Abweichung von der bekannten Hgb-Lösung beträgt 0,63 %.

Ergebnis: Die Cyanmethämoglobin-Methode zeigte sich bei unseren Untersuchungen nicht genauer als die Hämochromogen-Methode.

- b) Überprüfung der Aussage, daß sich die Extinktion von Hämatin zwischen 556 und 580 nm fast nicht ändert anhand einer wässrigen Lösung (selbst hergestellter Cyanmethämoglobin-Standard):

Herstellung des Standards wie auf Seite 13 beschrieben.

0,2 ml der Hgb-Lösg. + 15 ml 0,9 %ige NaCl
= 76-fache Verdünnung

davon 1 ml Hgb-Lösg. + 4 ml 0,9 %ige NaCl
= 76 x 5-fache Verdünnung
= 380-fache Verdünnung (wird als Standard gewählt)

0,2 ml Standard + 5 ml Drabkin-R. = 26-fache Verdünnung

$E_{540} = 0,071 \quad 0,071 \quad 0,069 \quad 0,070 \quad 0,069 \quad 0,070$

$$\frac{1,65 \cdot 0,07 \cdot 26}{11,2} = 0,2611 \text{ g \% Hgb}$$
$$= 261 \text{ mg \% Hgb}$$

Der selbst hergestellte Standard enthält 261 mg Hgb/100 ml.
Die vierfache Verdünnung enthält 65,25 mg Hgb/100 ml.

- aa) Hämatinbildung bei 2-facher Verdünnung

2 ml Standard (4-fach verdünnt) + 2 ml 10 %ige NaOH

$E_{556} = 0,116 \quad 0,118 \quad 0,118 \quad 0,118 \quad 0,118$

$E_{580} = 0,113 \quad 0,113 \quad 0,113 \quad 0,113 \quad 0,113$

mittlere Diff. = 0,005

- bb) Hämochromogenbildung bei 2-facher Verdünnung

2 ml Standard (4-fach verdünnt) + 2 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

E ₅₅₆ =	0,550	0,552	0,556	0,555	0,552	0,555	0,558
E ₅₈₀ =	0,046	0,046	0,046	0,047	0,046	0,046	0,047
Diff. =	0,504	0,496	0,510	0,508	0,506	0,499	0,509
mittlere Diff. = 0,504							

Berechnung nach der Hgb-Konzentration:

$$\frac{1,65 \cdot 0,504 \cdot 2}{26,6} = 62,451 \text{ mg \% Hgb}$$

Die Abweichung vom Standard beträgt 4,28 %.

cc) Berechnung der obigen Extinktionsdifferenz von Hämatin
(0,005) als Hämochromogen:

$$\frac{1,65 \cdot 0,005 \cdot 2}{26,6} = 0,00062 \text{ g \% Hgb}$$

$$= 0,62 \text{ mg \% Hgb}$$

Dies ergibt im Bezug auf den Standard einen Fehler von 0,24 %, kann also ohne weiteres vernachlässigt werden.

c) Überprüfung der Aussage, daß durch die Bildung der Differenz eines Absorptionsmaximums mit einem Absorptionsminimum Störfaktoren, wie z. B. Trübungen, ausgeschaltet werden (gilt nicht für Farbstoffe mit eigenem Absorptionsspektrum):

aa) Gelegentlich kommt es im Laufe der Messungen zu einer Erhöhung oder Erniedrigung der Extinktionen, die mit der Differenz von Maximum und Minimum wieder ausgeglichen werden können.

Beispiel 1:

E ₅₄₀ =	0,160	0,155	0,153	0,150	0,150	0,148
E ₆₆₅ =	0,108	0,103	0,103	0,100	0,098	0,098
Diff. =	0,052	0,052	0,050	0,050	0,052	0,050
mittlere Diff. = 0,051						

Beispiel 2:

$$E_{556} = 0,088 \quad 0,090 \quad 0,092 \quad 0,096 \quad 0,100 \quad 0,106$$

$$E_{580} = 0,068 \quad 0,070 \quad 0,074 \quad 0,078 \quad 0,082 \quad 0,086$$

$$\text{Diff.} = 0,020 \quad 0,020 \quad 0,018 \quad 0,018 \quad 0,018 \quad 0,020$$

$$\text{mittlere Diff.} = 0,019$$

Bei Beispiel 1 und 2 bleibt die Differenz jeweils annähernd gleich.

- bb) Bei gleicher Hgb-Konzentration des Plasmas kann es gelegentlich zu sehr unterschiedlichen Extinktionen im Bereich 556 und 580 nm kommen, die nur über die Differenzmethode richtig ausgewertet werden können.

Beispiel 1: (Nüchternblut)

Hämatinbildung:

$$E_{556} = 0,274 \quad 0,275 \quad 0,276 \quad 0,279 \quad 0,279$$

$$E_{580} = 0,253 \quad 0,253 \quad 0,255 \quad 0,259 \quad 0,258$$

$$\text{Diff.} = 0,021 \quad 0,022 \quad 0,021 \quad 0,020 \quad 0,021$$

$$\text{mittlere Diff.} = 0,021$$

Hämochromogenbildung:

$$E_{556} = 0,268 \quad 0,265 \quad 0,263 \quad 0,268$$

$$E_{580} = 0,232 \quad 0,231 \quad 0,228 \quad 0,233$$

$$\text{Diff.} = 0,036 \quad 0,034 \quad 0,035 \quad 0,035$$

$$2 - 1 = 0,035 - 0,021 = 0,014$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,014 \cdot 4}{27,2} = 0,003393$$

$$= 3,393 \text{ mg \% Hgb}$$

Beispiel 2: (Blutabnahme 1 Stunde nach dem Mittagessen)

Hämatinbildung:

$$E_{556} = 0,682 \quad 0,682 \quad 0,685 \quad 0,685$$

$$E_{580} = 0,637 \quad 0,638 \quad 0,642 \quad 0,642$$

$$\text{Diff.} = 0,045 \quad 0,044 \quad 0,043 \quad 0,043$$

$$\text{mittlere Diff.} = 0,044$$

Hämochromogenbildung:

$$E_{556} = 0,675 \quad 0,672 \quad 0,668 \quad 0,668$$

$$E_{580} = 0,617 \quad 0,615 \quad 0,610 \quad 0,610$$

$$\text{Diff.} = 0,058 \quad 0,057 \quad 0,058 \quad 0,058$$

$$2 - 1 = 0,058 - 0,044 = 0,014$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,014 \cdot 4}{27,2} = 0,003393$$
$$= 0,393 \text{ mg \% Hgb}$$

Obwohl das Absorptionsmaximum von Hämochromogen bei Beispiel 1 mit seiner Extinktion zwischen 0,200 - 0,300 liegt und das von Beispiel 2 zwischen 0,600 - 0,700, ist die Hämochromogen- bzw. Hgb-Konzentration bei beiden Beispielen gleich.

4. Notwendige Reagentien und Arbeitsmaterial:

1. Für die Hämochromogen-Methode

- a) 10 %ige NaOH
- b) Natriumdithionit pro analyse

2. Für die Cyanmethämoglobin-Methode:

- a) 20 %iges Kaliumferricyanid
- b) 10 %iges Kaliumcyanid
- c) 0,9 %iges NaCl-Lösung
- d) Drabkin-Reagens für die klassische Methode

3. Für die Pyridinhämochromogen-Methode

- a) 10 %iges Ammoniak
- b) Pyridin pro analyse
- c) Natriumdithionit pro analyse

4. Aqua dest. zum Verdünnen

5. Pipetten zu 1 ml, 2 ml, 5 ml und 10 ml, Saugpipette und Reagensgläser

6. Spektralphotometer der Firma Zeiss und Quarzkuvetten mit 1 cm Durchmesser.

5. Arbeitsanleitung für die Versuchsreihen

- a) Nüchternblut ist nicht unbedingt notwendig, ist aber zur Vermeidung von unnötigen Trübungen vorzuziehen. Bei stärkeren Trübungen kommt es zu Ungenauigkeiten im Ablesen der Extinktion bzw. zu nicht meßbaren Extinktionen.
- b) Um eine Hämolyse möglichst zu vermeiden, präparierten wir ein trockenes und sauberes Reagensglas mit Lique-min, sodaß die Wand nur benetzt blieb (bei sehr vorsichtigem Arbeiten erzielten wir auch ohne Lique-min dieselben Ergebnisse). Das Hantieren mit Wasser ist wegen Hämolysegefahr unbedingt zu meiden.
- c) Die Blutentnahme (etwa 10 ml) muß mit einer V_{2a} -Nadel und ohne Stauung erfolgen. Wurde zu Beginn gestaut oder mit einer Spritze Blut abgezogen, so ist dieses zu verwerfen. Bei der Abnahme muß das Blut am Rand des Gläschens entlang laufen. Wenn wir es auftropfen ließen, kam es nach unseren Beobachtungen stets zu einer geringen Hämolyse, ebenso bei stark verzögertem Laufen.
- d) Das entnommene Blut muß möglichst rasch zentrifugiert werden. Bis zu einer Stunde nach der Blutentnahme sahen wir keine beachtlichen Abweichungen im Hgb-Gehalt. Wir zentrifugierten 10 Minuten lang bei 3000 Touren.
- e) Das Plasma soll möglichst sofort nach dem Zentrifugieren mit einer Saugpipette abgesaugt werden. Es kann dann über Tage aufbewahrt werden. Jedoch ist möglichst schnelles Verarbeiten zu empfehlen, da die Umwandlung des Hgb in MHA bei unserer Methode einen Ungenauigkeitsfaktor darstellt (allerdings nur bei Hgb-Werten über 100 mg %).

- f) Der Einfachheit halber nahmen wir alle Messungen bei der selben Plasmaverdünnung vor. Wir wählten die 4-fache Verdünnung. Der Extinktionskoeffizient für Hämochromogen wurde bei 4-facher Plasmaverdünnung mit 27,2 für 1 mMol pro l ermittelt. Er wurde errechnet aus dem Extinktionskoeffizienten 26,6 für wässrige Lösungen und dem Extinktionskoeffizienten 28,9 für plasmatische Lösungen (die Differenz beträgt 2,3. Für 4-fach verdünntes Plasma gilt $26,6 + \frac{2,3}{4} = 27,2$). Meßbare Extinktionen erhält man bei diesem Verdünnungsverhältnis bei einem Plasma-Hgb-Gehalt bis zu 140 mg %. Bei einem höheren Hgb-Gehalt muß das Plasma entsprechend stärker verdünnt werden und der Extinktionskoeffizient rechnerisch neu ermittelt werden.
- g) Nach der Überführung des Plasma-Hgb in Hämochromogen (z. B.: 1 ml Plasma + 3 ml 10 %ige NaOH) wird die plasmatische Lösung in die Probekuvette gefüllt und die Extinktion gegen Aqua dest. als Leerwert bei 556 und 580 nm gemessen. Anschließend wird das Plasma-Hgb in Hämatin übergeführt (z. B.: 1 ml Plasma + 3 ml 10 %ige NaOH und einige Körnchen Natriumdithionit) und nach 10 Minuten ebenfalls bei 556 und 580 nm gegen Aqua dest. als Leerwert gemessen. Alle Messungen wurden mindestens fünfmal hintereinander durchgeführt und der Mittelwert der Differenz $E_{556} - E_{580}$ nm in die Berechnung eingesetzt. Die Extinktion von Hämatin (entspricht der Plasmaextinktion) wird von der Extinktion von Hämochromogen substrahiert und diese Extinktions-Differenz in die Berechnung der Plasma-Hgb-Konzentration eingesetzt.

Es gilt die Formel:

$$\frac{1,65 \cdot \text{Verdünnung} \cdot \text{Extinktion}}{\text{Extinktionskoeffizient}}$$

$$\text{Verdünnung} = 4$$

$$\text{Extinktionskoeffizient} = 27,2$$

Mit 1,65 wurde das Molekulargewicht von 16 520 für Hgb eingesetzt.

Beispiel:

1. Hämatinbildung:

$$E_{556} = 0,318 \quad 0,316 \quad 0,318 \quad 0,316$$

$$E_{580} = 0,296 \quad 0,293 \quad 0,295 \quad 0,295$$

$$\text{Diff.} = 0,022 \quad 0,023 \quad 0,023 \quad 0,021$$

$$\text{mittl. Diff.} = 0,022$$

2. Hämochromogenbildung:

$$E_{556} = 0,324 \quad 0,324 \quad 0,323 \quad 0,322 \quad 0,321$$

$$E_{580} = 0,286 \quad 0,286 \quad 0,283 \quad 0,283 \quad 0,283$$

$$\text{Diff.} = 0,038 \quad 0,038 \quad 0,040 \quad 0,039 \quad 0,038$$

$$\text{mittl. Diff.} = 0,038$$

$$2. - 1. = 0,038 - 0,022 = 0,016$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,016 \cdot 4}{27,2} = 0,003882 \text{ g \% Hgb}$$

$$= 3,882 \text{ mg \% Hgb}$$

6. Versuchsanordnung zur Aufstellung der Eichkurve (s. Abb. 11)

A) Beliebiges Plasma 4-fach verdünnt

1. Hämatinbildung

Diff. 556 - 580 nm

2. Hämochromogenbildung

Diff. 556 - 580 nm

3. Errechnen der Hgb-Konzentration

4. Auftragen der Konz. auf der Abszisse, Auftragen der Extinktionsdiff. von Hämochromogen und Hämatin auf der Ordinate

- B) 1. 2 ml obigen Plasmas + 2 ml einer Hgb-Lösung von bekannter Konz. (Hgb-Gehalt der Hgb-Lösung wird dabei 2-fach verdünnt) = Lösung A
2. Hämatinbildung
indem man zu der Hälfte der Lösung A (= 2 ml) den gleichen Teil 10 %ige NaOH zufügt → 4-fache Plasma-verdünnung und 4-fach verd. Hgb-Lösung
3. Hämochromogenbildung
aus 2 ml Lösung A + gleicher Anteil von 10 %iger NaOH und Natriumdithionit
4. Errechnen der Differenz von Hämochromogen-Hämatin und Errechnen der Hgb-Konz. nach oben genannter Formel (= 4-fach verd. Plasma-Hgb + 4-fach verd. Hgb der wässrigen Lösung)
5. Auftragen der Konz. auf der Abszisse, Auftragen der Differenz der Extinktionen von Hämochromogen und Hämatin auf der Ordinate.
- C) 2 ml Plasma + 2 ml Hgb-Lösung einer höheren oder niedrigeren Konzentration
- Punkt 2 - 5 wie unter B
- D - G : jeweils andere Konz. der bekannten Hgb-Lösung (s. S. 32 und 33).

Die Verbindungspunkte müssen eine Gerade ergeben.

Ausführung:

- A) Bestimmung der Hgb-Konz. eines Standards aus kristallisiertem Hgb
- Cyanmethämoglobin-Bildung mit Drabkin / 11-fache Verd.

0,5 ml Hgb-Lösung + 5 ml Drabkin-R.

$$E_{540} = 0,118 \quad 0,119 \quad 0,118 \quad 0,118 \quad 0,118$$

$$\text{Mittelwert} = 0,118$$

$$\frac{1,65 \cdot 11 \cdot 0,118}{11,5} = 186,2 \text{ mg \% Hgb}$$

Die bekannte Hgb-Lösung zur Aufstellung der Eichkurve beträgt 186 mg Hgb / 100 ml = Standard

B) Bestimmung der Hgb-Konzentration von Eigenplasma zur Aufstellung der Eichkurve

1. Hämatinbildung / 4-fach verdünnt

1 ml Plasma + 3 ml 10 %ige NaOH

$$E_{556} = 0,049 \quad 0,049 \quad 0,049 \quad 0,049 \quad 0,050$$

$$E_{580} = 0,042 \quad 0,042 \quad 0,043 \quad 0,042 \quad 0,043$$

$$\text{Diff.} = 0,007 \quad 0,007 \quad 0,006 \quad 0,007 \quad 0,007$$

$$\text{mittl. Diff.} = 0,007$$

2. Hämochromogenbildung / 4-fach verdünnt

1 ml Plasma + 3 ml 10 %ige NaOH + Natriumdithionit

$$E_{556} = 0,044 \quad 0,045 \quad 0,048 \quad 0,048 \quad 0,049 \quad 0,050 \quad 0,049 \quad 0,049$$

$$E_{580} = 0,028 \quad 0,029 \quad 0,029 \quad 0,031 \quad 0,031 \quad 0,031 \quad 0,032 \quad 0,032$$

$$\text{Diff.} = 0,016 \quad 0,016 \quad 0,019 \quad 0,017 \quad 0,018 \quad 0,019 \quad 0,017 \quad 0,017$$

$$\text{mittl. Diff.} = 0,017$$

$$2. - 1. = 0,010$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,01 \cdot 4}{27,2} = 2,448 \text{ mg \% Hgb}$$

4-fach verd. Eigenplasma enthält 0,6 mg % Hgb

C) Verdünnung des Standards von 186 mg % Hgb zur Aufstellung der Eichkurve.

1. 2-fach verd. = 93 mg % Hgb / Lösg. 1

2 ml Standard + 2 ml Aqua dest. = 4 ml

2. 3-fach verd. = 62 mg % Hgb / Lösg. 2

2 ml Standard + 4 ml Aqua dest. = 6 ml

3. 6-fach verd. = 31 mg % Hgb / Lösg. 3
1 ml Standard + 5 ml Aqua dest. = 6 ml
4. 4-fach verd. = 46,5 mg % Hgb / Lösg. 4
1,5 ml Stand. + 4,5 ml Aqua dest. = 6 ml
5. 8-fach verd. = 23,25 mg % Hgb / Lösg. 5
1 ml Stand. + 7 ml Aqua dest. = 8 ml
6. 15-fach verd. = 12,4 mg % Hgb / Lösg. 6
0,5 ml Stand. + 7 ml Aqua dest. = 7,5 ml

D) 1. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 1 (93 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml Gemisch von D) 1. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

mittl. Diff. von $E_{556} - E_{580} = 0,039$

b) Hämochromogenbildung

1 ml Gemisch von D) 1. + 1,5 ml 10 %ige NaOH + Natriumdith.

mittl. Diff. von $E_{556} - E_{580} = 0,421$

$b - a = 0,421 - 0,039 = 0,382$

$\frac{1,65 \cdot 0,382}{27,2} = 0,02317$

$= 23,17 \text{ mg \%}$

Gesamt-Hgb = 23,17 mg % + 0,6 mg %

$= \underline{23,77 \text{ mg \%}}$

theoret. Wert = 23,25 mg % + 0,6 mg %

$= \underline{23,85 \text{ mg \% Hgb}}$

2. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 2 (62 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 2. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

mittl. Diff. von $E_{556} - E_{580} = 0,0215$

b) Hämochromogenbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 2. + 1,5 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,279$$

$$b - a = 0,279 - 0,0215 = 0,2575$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,2575}{27,2} = 0,01562$$

$$= 15,62 \text{ mg \% Hgb}$$

$$\text{Ges. Hgb} = 15,62 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} = \underline{16,22 \text{ mg \%}}$$

$$\begin{aligned} \text{theoret. Wert} &= 15,5 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= \underline{16,1 \text{ mg \% Hgb}} \end{aligned}$$

3. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 3 (31 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 3. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,037$$

b) Hämochromogenbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 3. + 1,5 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,163$$

$$b - a = 0,163 - 0,037 = 0,126$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,126}{27,2} = 0,00764$$

$$= 7,64 \text{ mg \% Hgb}$$

$$\begin{aligned} \text{Ges. Hgb} &= 7,64 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= \underline{8,24 \text{ mg \%}} \end{aligned}$$

$$\text{theoret. Wert} = 7,75 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} = \underline{8,35 \text{ mg \%}}$$

4. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 4 (46,5 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 4. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,031$$

b) Hämochromogenbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 4. + 1,5 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,220$$

$$b - a = 0,220 - 0,031 = 0,189$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,189}{27,2} = 0,01146$$

$$= 11,46 \text{ mg \% Hgb}$$

$$\begin{aligned} \text{Ges. Hgb} &= 11,46 \text{ mg \% Hgb} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= \underline{12,06 \text{ mg \%}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{theoret. Wert} &= 11,5 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= \underline{12,1 \text{ mg \%}} \end{aligned}$$

5. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 5 (23,25 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 5. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,028$$

b) Hämochromogenbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 5. + 1,5 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,127$$

$$b - a = 0,127 - 0,028 = 0,099$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,099}{27,2} = 0,00600$$

$$= 6,00 \text{ mg \%}$$

$$\begin{aligned} \text{Ges. Hgb} &= 6,00 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= \underline{6,6 \text{ mg \%}} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{theoret. Wert} &= 5,81 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%} \\ &= 6,41 \text{ mg \% Hgb} \end{aligned}$$

6. 2 ml Plasma + 2 ml Lösg. 6 (12,4 mg % Hgb)

a) Hämatinbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 6. + 1,5 ml 10 %ige NaOH

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,024$$

b) Hämochromogenbildung

1,5 ml des Gemisches von D) 6. + 1,5 ml 10 %ige NaOH
+ Natriumdithionit

$$\text{mittl. Diff. von } E_{556} - E_{580} = 0,077$$

$$b - a = 0,077 - 0,024 = 0,053$$

$$\frac{1,65 \cdot 0,053}{27,2} = 0,00321$$
$$= 3,21 \text{ mg \% Hgb}$$

$$\text{Ges. Hgb} = 3,21 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%}$$
$$= \underline{3,81 \text{ mg \%}}$$

$$\text{theoret. Wert} = 3,1 \text{ mg \%} + 0,6 \text{ mg \%}$$
$$= \underline{3,7 \text{ mg \% Hgb}}$$

Das Vierfache der experimentell erhaltenen Konzentrationen
ist in die Eichkurve einzutragen.

	Experiment.Wert/mg % Hgb	theoret.Wert/mg % Hgb
1.	$23,77 \cdot 4 = 95,08$	$23,85 \cdot 4 = 95,4$
2.	$16,22 \cdot 4 = 64,66$	$16,1 \cdot 4 = 64,4$
3.	$8,24 \cdot 4 = 32,96$	$8,35 \cdot 4 = 33,4$
4.	$12,06 \cdot 4 = 48,24$	$12,1 \cdot 4 = 48,4$
5.	$6,6 \cdot 4 = 26,4$	$6,41 \cdot 4 = 25,64$
6.	$3,81 \cdot 4 = 15,24$	$3,7 \cdot 4 = 14,8$

V. E r g e b n i s s e
=====

Die untersuchten Personen wurden fast ausschließlich auf
der Medizinischen Abteilung des Städtischen Krankenhauses
Landshut ausgewählt, zu einem kleinen Teil aus dem Kreis-
krankenhaus Altötting und Rotthalmünster und der urologi-
schen Abteilung des Krankenhauses Neuötting. Die Messungen
wurden allein im Labor des Städt. Krankenhauses Landshut
durchgeführt. Aus den Krankenhäusern Altötting, Neuötting
und Rotthalmünster wurde das Plasma nach Landshut trans-
portiert. Von dieser Möglichkeit konnten wir uns durch

Kontrollen mit Eigenplasma überzeugen.

Wir verwerteten in unseren Ergebnissen das Plasma von insgesamt 133 Personen. Davon wurde bei 44 gesunden Personen der Hgb-Gehalt bestimmt. Die restlichen 89 Plasmen wurden drei größeren pathologischen Untergruppen zugeordnet. In die Gruppe der Autoaggressionskrankheiten fielen 37 Plasmen, in die Gruppe der malignen Tumoren, einschließlich Hämoblastosen, fielen 36 Plasmen, die Gruppe der chronischen Infekte umfaßte 16 Plasmen.

Sämtliche Bestimmungen wurden mit der Differenzmethode Hämochromogen-Hämatin durchgeführt (s.Seite 33).

Bei unserem Untersuchungsgut handelt es sich um Stichproben aus der Grundgesamtheit. Wir versuchten eine variationsstatistische vergleichende Erfassung der einzelnen Gruppen.

1. Normalblute

(Plasma-Hgb-Gehalt bei 44 gesunden Personen)

Diese Personenreihe wurde ausschließlich aus dem Personal der Krankenhäuser Landshut, Altötting, Neuötting und Roththalmünster ausgewählt. Das Alter lag zwischen 18 und 40 Jahren. Darunter waren 24 Frauen und 20 Männer. Da sich die Verteilung der Hgb-Werte bei Männern und Frauen nicht wesentlich unterschied, verzichteten wir auf eine Differenzierung zwischen männlichem und weiblichem Untersuchungsgut. Aufgenommen wurde in die Gruppe der gesunden Personen nach anamnestischem Ausschluß einer chronischen Erkrankung bei normaler BKS und Leukozytenzahl und annähernd normalem Hgb-Wert im Vollblut.

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	3,154	6	1,941
2	2,081	7	2,668
3	3,154	8	3,396
4	2,426	9	4,367
5	1,091	10	3,154

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
11	2,668	28	3,396
12	2,911	29	2,183
13	2,081	30	2,183
14	3,882	31	3,154
15	2,183	32	1,941
16	2,426	33	2,426
17	3,154	34	2,668
18	2,911	35	2,183
19	2,668	36	2,911
20	3,154	37	3,396
21	2,426	38	1,941
22	3,882	39	2,426
23	2,183	40	2,081
24	2,911	41	2,183
25	2,081	42	2,668
26	2,183	43	3,396
27	2,668	44	3,882

Bestimmung des Mittelwertes nach der Formel

$$\bar{x} = \frac{Sx}{n}$$

x = Einzelwert

S = Summe

n = Anzahl der Glieder

$$\bar{x} = 2,701$$

=====

Der Plasma-Hgb-Gehalt beträgt bei den untersuchten 44 Personen im Mittel 2,701 mg %.

Bestimmung der Standardabweichung nach der Formel

$$s = \frac{S (x - \bar{x})^2}{n - 1}$$

$$s = \pm 0,655$$

=====

Standardabweichung des Mittels bzw. Fehler des Mittelwertes

$$s_{\bar{x}} = \frac{s}{n}$$

$$s_{\bar{x}} = \pm 0,099$$

=====

Grenzwerte und Vertrauensbereich für P = 5 %

$$\bar{x} \pm t \times s_{\bar{x}}$$

t für P = 5 % bei 44 Gliedern = 2,0154

(entnommen aus den wissenschaftl. Tabellen von
Documenta Geigy)

$$2,701 \pm 0,0154 \cdot 0,099$$

$$= 2,701 \pm 0,1995246$$

Oberster Grenzwert: 2,701 + 0,2

$$= 2,901$$

=====

Unterster Grenzwert: 2,701 - 0,2

$$= 2,501$$

=====

14 Werte liegen über dem oberen Grenzwert

20 Werte liegen unter dem unteren Grenzwert

10 Werte liegen im Vertrauensbereich = 22,7 %

Unsere Normalwerte streuen so stark, daß man keinen Vertrauensbereich aufstellen kann. Wir möchten die Streuung als physiologisch bedingt auffassen. Als obere Grenze der Normalwerte haben wir entsprechend unserer Versuchsergebnisse 4,367 mg % Hgb festgesetzt, obwohl dieser Wert nicht als absolut zu betrachten ist.

2. Autoaggressionskrankheiten

a) Primär chronische Polyarthrititis

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	4,852	10	12,006
2	7,278	11	3,882
3	4,281	12	2,911
4	4,610	13	2,669
5	1,941	14	4,852
6	3,396	15	1,213
7	1,720	16	5,580
8	2,911	17	9,220
9	2,183	18	10,919

b) Chronische Hepatitis

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	1,698	8	8,977
2	4,974	9	10,919
3	3,154	10	3,154
4	5,095	11	4,367
5	18,801	12	7,279
6	4,852	13	7,036
7	3,154	14	6,064

c) Chronische Glomerulonephritis

Nr.	mg % Hgb
1	12,617
2	4,232
3	16,985

d) Weitere Autoaggressionskrankheiten

Nr.	mg % Hgb
1 (Kälteagglutinations-Kh)	6,794
2 (Sklerodermie)	7,764

3. Maligne Tumore:

a) Carcinome und Sarkome

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	2,911	13	8,492
2	4,367	14	0,971
3	3,396	15	5,338
4	0,971	16	3,154
5	4,128	17	1,941
6	2,791	18	1,213
7	3,882	19	3,882
8	6,312	20	2,911
9	14,315	21	1,720
10	3,882	22	3,396
11	1,720	23	4,610
12	4,128		

b) Hämoblastosen

Nr.	mg % Hgb
1 (Chron.lymph.Leuk.)	8,250
2 (Chron.lymph.Leuk.)	22,565
3 (Chron.myel.Leuk.)	2,669
4 (Chron.myel.Leuk.)	3,154
5 (Chron.lymph.Leuk.)	29,110
6 (Panmyelophthise)	4,852
7 (Chron.lymph.Leuk.)	9,705
8 (Plasmocytom)	2,647

c) Prolif. Prozesse des lymphoretik. Systems

Nr.	mg % Hgb
1 (Lymphobl.Retikulosarkom)	2,911
2 (M.Hodgkin)	14,315
3 (M.Hodgkin)	6,067
4 (Afibrill.Rethothelsarkom)	6,272

4. Chronische Infekte

a) Chron. Pyelonephritis einschließlich chron. Harnwegsinfekte

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	5,581	5	2,183
2	5,337	6	10,191
3	5,095	7	6,926
4	1,213	8	2,183

b) Chron. Cholangitis

Nr.	mg % Hgb	Nr.	mg % Hgb
1	12,617	5	4,852
2	4,128	6	1,941
3	5,338	7	2,308
4	4,246	8	4,852

5. Beurteilung der Krankheitsgruppen:

a) Autoaggressionskrankheiten:

Wir untersuchten insgesamt 37 Plasmen dieser Gruppe und fanden dabei 21 Werte, die über 4,367 mg %, der oberen Grenze unserer Normalwerte lagen. Somit zeigten 56,75 % der Plasmen dieser Gruppe ein erhöhtes Plasma-Hgb bzw. eine gesteigerte Hämolyse an. In der Untergruppe der PCP waren 8 von 18 Hgb-Werten erhöht, das sind 44,44 %. Der höchste Wert lag bei 12,006 mg %. In der Untergruppe der chronischen Hepatitis waren 9 von 14 Hgb-Werten erhöht, das sind 64,28 %. Der höchste Wert lag bei 18,801 mg %. In der kleineren Untergruppe der chronischen Glomerulonephritis waren 2 von 3 Hgb-Werten erhöht, der höchste Wert lag bei 16,985 mg %. In der letzten Untergruppe zweier Autoaggressionskrankheiten waren beide Werte erhöht, der höchste Wert lag bei 7,764 mg %.

b) Maligne Tumoren:

Wir untersuchten insgesamt 35 Plasmen dieser Gruppe und erhielten dabei 13 Werte, die über der oberen Grenze unserer Normalwerte lagen. Somit zeigten 37,14 % der Plasmen dieser Gruppe einen erhöhten Hgb-Wert. In der Untergruppe der Carcinome und Sarkome waren 5 von 23 Hgb-Werten erhöht, das sind 21,73 %. Der höchste Wert lag bei 14,315 mg %. In der Untergruppe der Hämoblastosen waren 5 von 8 Hgb-Werten erhöht, das sind 62,50 %. Der höchste Wert lag bei 29,110 mg %. In der Untergruppe der proliferierenden Prozesse des RES waren 3 von 4 Hgb-Werten erhöht, der höchste Wert lag bei 14,315 mg %.

c) Chronische Infekte:

Wir untersuchten insgesamt 16 Plasmen dieser Gruppe und erhielten dabei 9 Werte, die über der oberen Grenze unserer Normalwerte lagen. Somit zeigten 56,25 % der Plasmen

dieser Gruppe einen erhöhten Hgb-Gehalt. In der Untergruppe der chronischen Harnwegsinfekte waren 5 von 8 Hgb-Werten erhöht, das sind 62,50 %. Der höchste Wert lag bei 10,191 mg %. In der Untergruppe der chronischen Cholangitis waren 4 von 8 Hgb-Werten erhöht, das sind 50 %. Der höchste Wert lag bei 12,617 mg %.

VI. TABELLEN

1. Autoaggressionskrankheiten	Plasma-Hgb	BKS	ρ Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(μ)	Bili	SGOT	SGPT
a) Primär chron. Polyarthrit										
1. PCP seronegativ	4,852	36/55		$\emptyset$	87 %	4,27			32,1	11,8
2. PCP seronegativ	7,278	135/149	29 %	$\emptyset$	54 %	2,98	38,6			
3. rheumat. Beschwerden seronegativ	4,281	55/119		$\emptyset$	82 %	4,51				
4. PCP seropositiv	4,610	36/70		+	83 %	4,05	65,3		o.B.	o.B.
5. PCP seropositiv	1,941	102/136	23 %	+	52 %	2,57				
6. PCP seropositiv	3,396	72/106	10 %	+	72 %	3,37				
7. PCP seropositiv	1,720	84/100	23 %	+	57 %	3,31			19,7	7,8
8. rheumat. Beschwerden seronegativ	2,911	60/95		$\emptyset$	90 %	4,16			21,7	25,8
9. PCP seropositiv	2,183	73/108	16 %	+	74 %	4,09			o.B.	o.B.
10. keine rheumat. Beschwerden seropositiv	12,006	30/58		+	80 %	4,14		0,38	o.B.	o.B.
11. PCP seronegativ	3,882	15/35	11 %	$\emptyset$	68 %	3,5			15,7	15,7
12. PCP seit 1930/seroneg.	2,911	135/146	24 %	$\emptyset$	54 %	2,56	28,9			
13. rheumat. Beschwerden seit 6 Wochen/seronegativ	2,669	34/76	19 %	$\emptyset$	85 %	4,12				
14. PCP seit 1952	4,852	44/69		+	86 %	4,6				
15. PCP seronegativ	1,213	25/37	18 %	$\emptyset$	91 %	4,52				
16. PCP seropositiv	5,580	63/89	21 %	+	73 %	3,4				
17. PCP seropositiv	9,220	78/104	25 %	+	64 %	3,37				
18. PCP seropositiv	10,919	78/105	50 %	+	87 %	4,46		3,95	64,6	21,7

b) Chronische Hepatitis	Plasma- Hgb	BKS	ρ Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
1. Beginnende kleinknotige Lebercirrhose	1,698	17/32	22 %		88 %	4,1		1,8	31,2	23
2. Subchron. Hepatitis	4,974	54/83	31 %		86 %	4,02	143,7	9,16	32,1	43,0
3. Geringe chron. Hepatitis	3,154	36/70	24 %		72 %	3,63	34,4	0,91	32,5	12,7
4. Zustand nach Hepatitis	5,095	17/42	29 %		90 %	4,2		0,72	30,0	19,7
5. Chron.aggressive Hepatitis	18,801	29/53	34 %		85 %	3,9		1,54	47,3	36,2
6. Zustand nach akuter Hepatitis	4,852	22/40	21 %		92 %	4,12		0,68	19,5	26,1
7. Subchron. Hepatitis	3,154	19/36	20 %		89 %	4,36		1,1	16,5	21,0
8. Posthepatitische kleinknotige Lebercirrhose	8,977	48/75			14,48	4,23		2,25	14,9	
9. Schwere fortschreitende Lebercirrhose	10,919	78/105	50 %	+	87 %	4,46		3,95	64,6	21,7
10. Fettleber mit chron. Gerüstfibrose	3,154	8/21	14 %		78 %	4,13			19,7	27,9
11. Kleinknotige Lebercirrhose	4,367	8/18	27 %		67 %	3,19			15,7	9,8
12. Lebercirrhose	7,279	37/59	25 %		71 %	3,24		0,75	27,6	31,4
13. Chronisch persistierende Hepatitis	7,036	4/9			96 %	4,72	119,6		40,7	54,6
14. Persistierende Hepatitis	6,064	1/3	13 %		95 %	4,39	190	0,2	9,8	9,8

c) Chron. Glomerulonephritis	Plasma- Hgb	BKS	ρ Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
1. Chron.Glomerulonephritis	12,617	14/32	16 %		86 %	4,72				
2. Chron.Glomerulonephritis	4,232	55/105	11 %	$\emptyset$	58 %	2,61				
3. Chron.Glomerulonephritis	16,985	22/37	26 %		61 %	3,26				

d) Weitere Autoaggressions- krankheiten	Plasma- Hgb	BKS	ρ Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
1. Kälteagglutinations- krankheit	6,794	99/134			72,1	3,38				
2. Sklerodermie	7,764	87/112	32 %		69 %	3,41				

2. Maligne Tumoren	Plasma- Hgb	BKS	ρ Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
a) Carcinome und Sarkome										
1. Adeno-Ca des Magens	2,911	52/89	13 %		39 %	1,87		1,44	30,0	19,7
2. Penis-Ca mit Me	4,367	102/136	o.B.		73 %	3,63				
3. Mamma-Ca	3,396	71/98	12 %		72 %	3,72				
4. Pleuracarcinose	0,971	12/27	16 %		70 %	3,59				
5. Bronchial-Ca	4,128	70/90	20 %		69 %	3,82				
6. Prostata-Ca	2,791	52/87	17 %		79 %	3,53				
7. Magen-Ca	3,382	14/34			8,8 g	2,79				
8. Mamma-Ca mit Me	6,312	17/41			12,8 g	3,69				
9. Bronchial-Ca	14,315	71/98	16 %		12,1 g	3,62				
10. Mamma-Ca mit Me	3,882	43/72	14 %		77 %	4,01			38,5	
11. Prostata-Ca	1,720	125/130	13 %		63 %	3,54			30,0	32,1
12. Blasen-Ca mit Me	4,128	32/62	18 %		82 %	4,13				
13. Colon-Ca	8,482	4/18	15 %		92 %	4,61				

	Plasma- Hgb	BKS	fGlob	Latex	Hgb	Ery	Fe(y)	Bili	SGOT	SGPT
14. Magen-Ca	0,971	33/47	18 %		61 %	2,94				
15. Magen-Ca	5,338	26/42			78 %	3,24				
16. Osteosarkom	3,154	68/94			80 %	3,17				
17. Hypernephrom	3,154	57/69			75 %	3,76				
18. Mamma-Ca	1,213	29/51			81 %	3,82				
19. Lungen-Ca	3,882	146/149	16 %		68 %	3,49				
20. Prostata-Ca	2,911	70/100	16 %	Ø	75 %	4,01				
21. Bronchial-Ca	1,720	63/96	21 %		84 %	4,46			11,8	9,8
22. Schilddrüsen-Adeno-Ca	3,396	67/84			82 %	4,27				
23. Hypernephrom mit Me	4,610	16/30			77 %	3,93				

b) Hämoblastosen	Plasma- Hgb	BKS	fGlob	Latex	Hgb	Ery	Fe(y)	Bili	SGOT	SGPT
1. Lymphat. Leukämie	8,250	11/27	11 %		65 %	3,45	60 f			
2. Lymphadenose	22,565	7/12			81 %	4,5				
3. Akute myeloische Leukämie	2,669	27/53	17 %		68 %	3,52			19,7	13,2
4. Chron. Myelose	3,154	75/112			69 %	3,18				
5. Chron. lymphat. Leukämie	29,110	140/145	18 %		53 %	2,70				
6. Panmyelophthise	4,852	57/83			46 %	2,13				

	Plasma- Hgb	BKS	p-Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
7. Lymphadenose	9,765	23/51			77 %	2,89				
8. Plasmozytom	2,647	78/102	36 %		83 %	3,71				

c) Proliferierende Prozesse des lymphoret. Systems	Plasma- Hgb	BKS	p-Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
1. Lymphobl.Retikulosarkom	2,911	10/27			84 %	3,9				
2. M. Hodgkin	14,315	78/112			34 %	1,02				
3. M. Hodgkin	6,067	60/105			60 %	3,26		18,36	25,8	21,7
4. Afibrilläres Rethothelsarkom	6,272	13/37			15,2	4,32				

3. Chronische Infekte	Plasma- Hgb	BKS	p-Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
a) Chron. Pyelonephritis und chron. Harnwegsinfekte										
1. Chron. Pyelonephritis	5,581	132/144	o.B.		69 %	3,65				
2. Chron. Pyelonephritis	5,337	11/27	o.B.		74 %	3,69			o.B.	o.B.
3. Chron. Pyelonephritis/ Schrumpfnieren	5,095	29/73			10,4g	3,4				
4. Chron. Pyelonephritis	1,213	48/88			9,8g	2,97				
5. Harnwegsinfekt	2,183	42/74			82 %	4,16				

	Plasma- Hgb	BKS	γ -Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
6. Chron. Harnwegsinfekt	10,191	126/135			43 %	2,68				
7. Chron. Pyelonephritis	6,926	17/28			67 %	3,27				
8. Chron. Cystitis	2,183	37/76	17 %		76 %	3,92				

b) Chronische Cholangitis	Plasma- Hgb	BKS	γ -Glob	Latex	Hgb	Ery	Fe(γ)	Bili	SGOT	SGPT
1. Chron. fibrosierende Cholangitis	12,617	15/40			85 %	4,32		1,8	24,2	23,7
2. Chron. Cholangitis	4,128	60/105			55 %	2,9				
3. Chron. Cholangitis	5,338	24/65			62 %	3,04				
4. Schwere fibrosierende Cholangitis	4,246	53/80	15 %		74 %	3,83		1,27	40,7	57,0
5. Chron. Cholangitis	4,852	36/55			87 %	4,87			32,1	11,8
6. Chron. fortschreitende Cholangitis	1,941	102/136	23 %		52 %	2,57				
7. Subchron. Cholangitis	2,308	73/101	27 %		68 %	3,56				
8. Chron. Cholangitis	4,852	31/56	23 %		86 %	4,5		0,7	23	19,2

VII. ABBILDUNGEN
=====

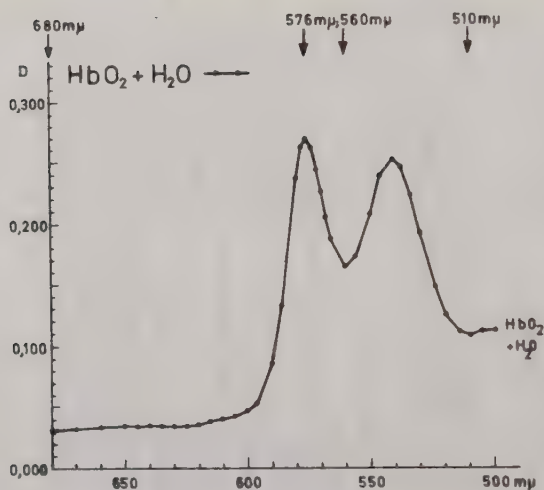


Abb.1) ABSORPTIONSKURVE FÜR OXYHÄMOGLOBIN
(Fleisch: Mesure de l'hémolyse par la détermination
dans le Plasma de l'hémoglobine,
la méthémoglobine et leurs dérivés)

Drei verschiedene Arten der Darstellung eines quantitativen Absorptionsspektrums gezeigt an Oxyhämoglobinslösungen verschiedener Konzentrationen.

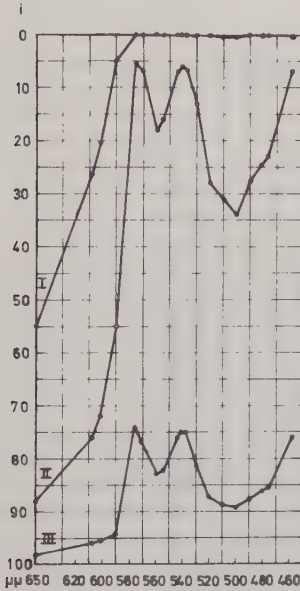


Abb. 3) Ordinate $i = J/J_0 = \%$ durchgelassenen Lichtes.
 Kurve I: $c = 0,007 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve II: $c = 0,0014 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve III: $c = 0,00014 \text{ g/cm}^3$.

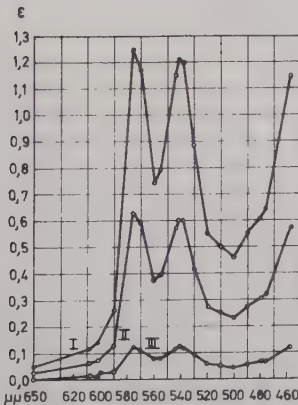


Abb. 2) Ordinate $\epsilon = \log \frac{I_0}{I}$ (Extinktionskoeffizient).
 Kurve I: $c = 0,0014 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve II: $c = 0,0007 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve III: $c = 0,00014 \text{ g/cm}^3$.

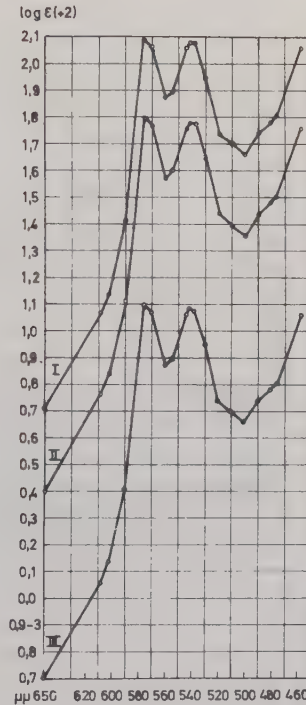


Abb. 4) Ordinate: $\log \epsilon (\times 2)$.
 Kurve I: $c = 0,0014 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve II: $c = 0,0007 \text{ g/cm}^3$.
 Kurve III: $c = 0,00014 \text{ g/cm}^3$.

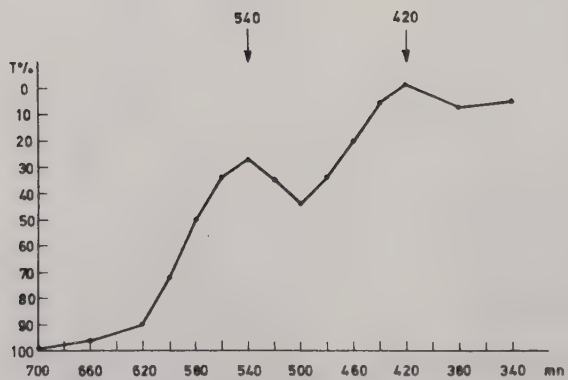


Abb. 5) ABSORPTIONSKURVE EINES CYANMETHÄMOGLOBINSTANDARDS
(Fa. Arid) Konzentration 79,68 mg/% Hgb

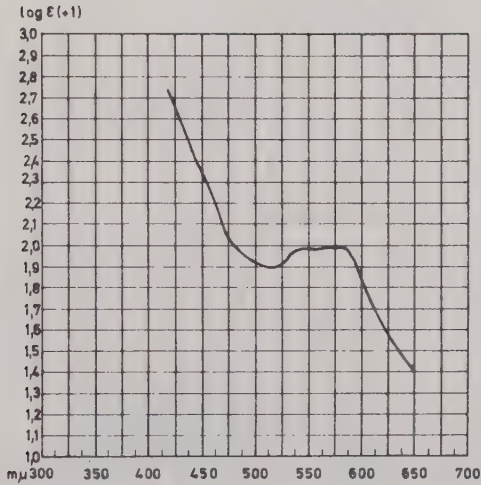


Abb. 6) ABSORPTIONSKURVE VON REDUZIERTEM HÄMIN

(Heilmeyer, L.: Medizinische Spektrophotometrie)

0,1% ige Häminlösung, reduziert mit $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ in 0,1n NaOH.

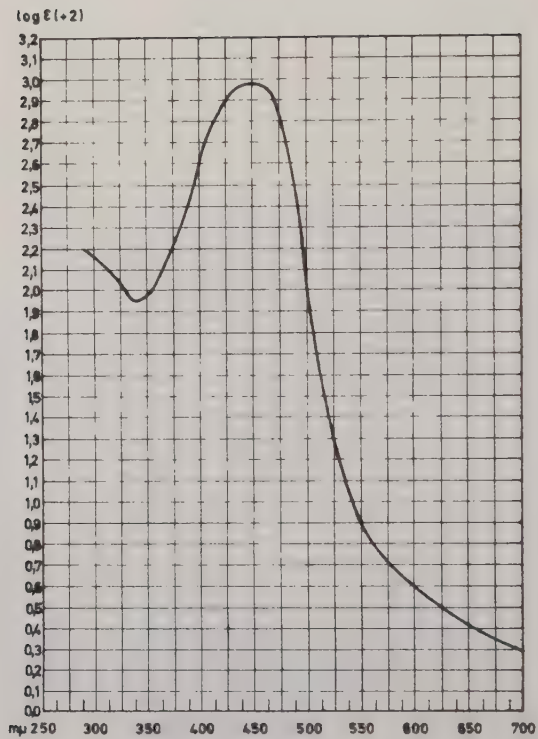


Abb. 7) ABSORPTIONSKURVE VON BILIRUBIN.

(Heilmeyer, L.: Medizinische Spektrophotometrie)

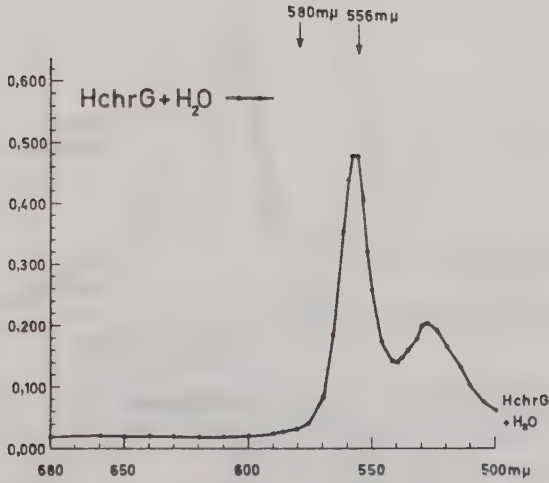


Abb. 8) ABSORPTIONSKURVE VON HÄMOCHROMOGEN.

(Fleisch: Mesure de l'hémolyse par la détermination
dans le Plasma de l'hémoglobine,
la méthémoglobine et leurs dérivés)

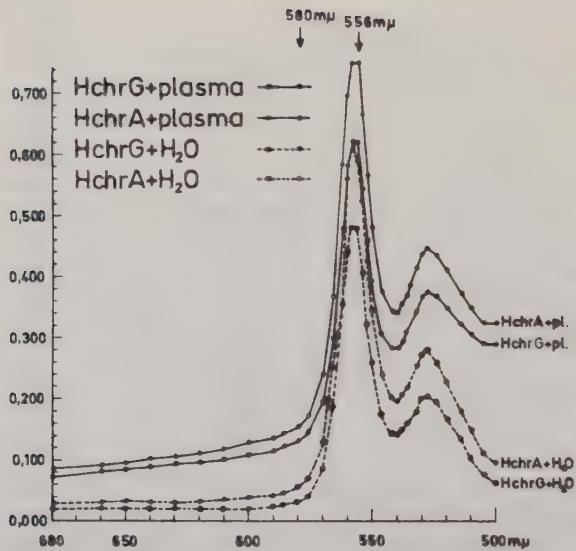


Abb. 9) ABSORPTIONSKURVE FÜR GLOBIN-HÄMOCHROMOGEN

(Fleisch: Mesure de l'hémolyse par la détermination
dans le Plasma de l'hémoglobine,
la méthémoglobine et leurs dérivés)

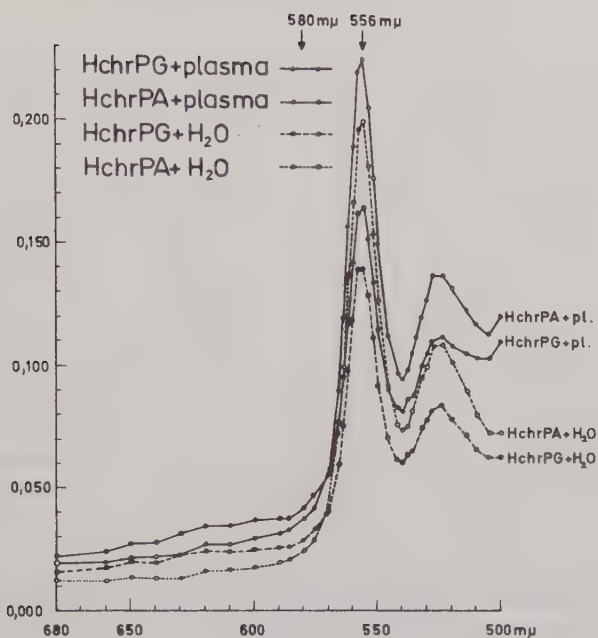


Abb.10) ABSORPTIONSKURVE FÜR PYRIDIN-GLOBIN-HÄMOCHROMOGEN.

(Fleisch: Mesure de l'hémolyse par la détermination
dans le Plasma de l'hémoglobine,
la méthémoglobine et leurs dérivés)

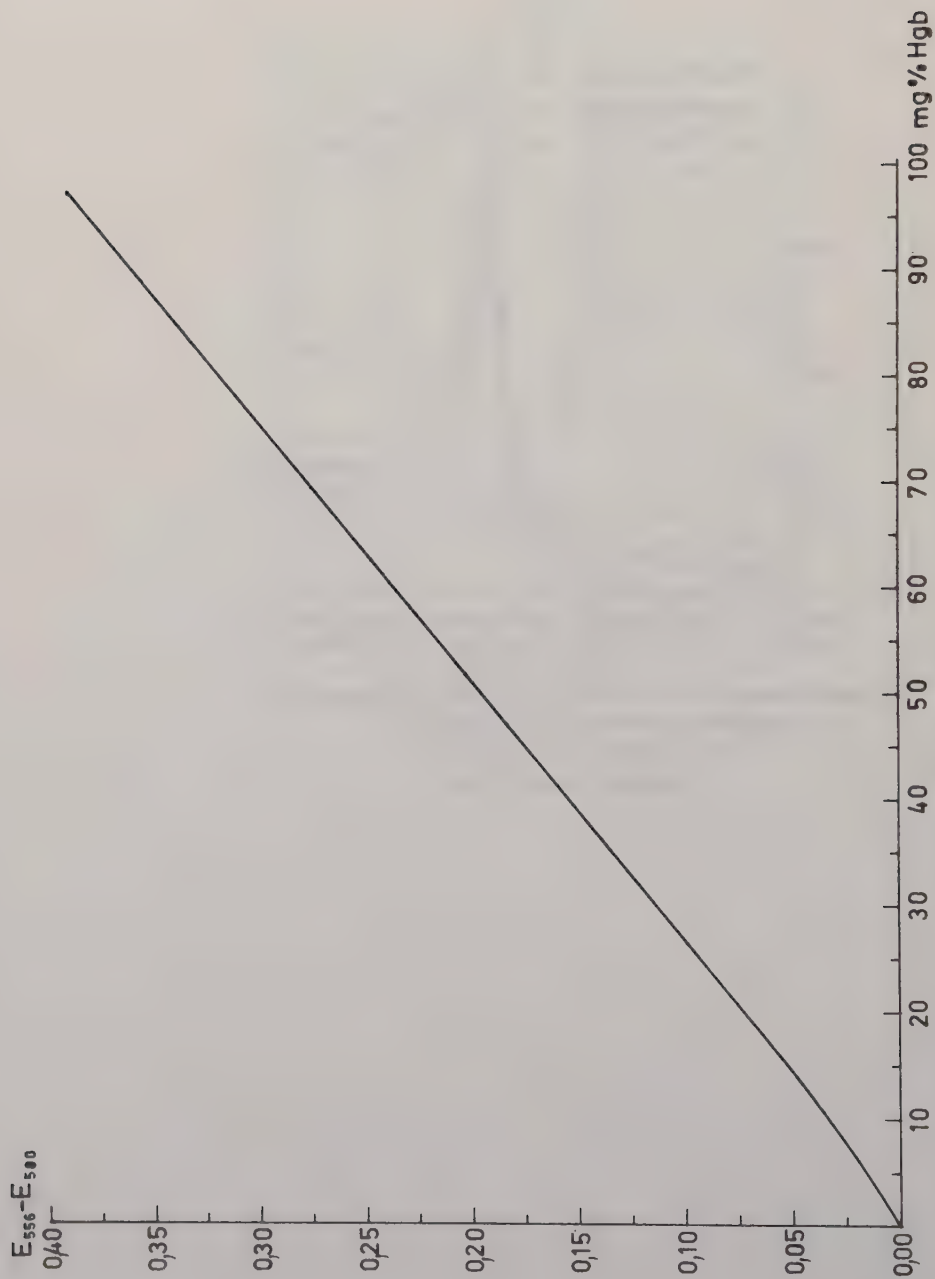


Abb.11) EICHKURVE FÜR HÄMOCHROMOGEN
-Hämatinmethode bei 4-facher Verdünnung

VIII. D i s k u s s i o n

=====

Wir haben uns in dieser Arbeit zur Aufgabe gestellt, das freie Hämoglobin im Plasma bei Gesunden und bei verschiedenen Krankheitsbildern zu bestimmen. Wir stießen auf die Dringlichkeit dieser Bestimmung bei einem tödlich verlaufenden Fall eines Schwartzmann-Sanarelli-Syndroms, in dessen Verlauf kostbare Zeit verloren ging, dadurch daß sich erst anhand einer gesteigerten Bilirubinämie der bereits seit ca. 15 Stunden bestehende Verdacht auf ein allergisches Geschehen bestätigte. Dasselbe Problem tritt bei Bluttransfusionszwischenfällen auf, wo das frühzeitige Erkennen einer Hämolyse für die Behandlung und Prognose entscheidend ist. Normalerweise ist man auf das Auftreten eines Ikterus und einer Hämoglobinurie angewiesen, die frühestens nach 12 Stunden auftreten. Die sicherste und frühzeitigste Erkennung der Hämolyse dürfte über die Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma erfolgen. Auch wenn man von hochdramatischen hämolytischen Erscheinungen z. B. im Rahmen eines allergischen oder toxischen Geschehens absieht, ist die Bestimmung des Plasma-Hgb-Gehaltes eine wesentliche Bereicherung in der Feststellung einer Hämolyse. Die üblichen Nachweise sind die osmotische Resistenzbestimmung der Erythrozyten, die Erythrozytenüberlebenszeit mit Cr₅₁ markierten Erythrozyten, genauer die Methodik mit DFP₃₂ nach DIEZ- EWALD und LAYRISSE, außerdem der Differential-Agglutinationstest nach ASHBY. Die Wegweiser sind Anämie und Bilirubinämie. Es kann aber auch ohne Anämie und Bilirubinämie eine gesteigerte Hämolyse vorliegen. Man spricht dann von latenter Hämolyse oder vom Syndrom der verkürzten Lebensdauer der Erythrozyten. Der Grad der Bilirubinämie ist abhängig von der Leistungsfähigkeit der Leber, der Grad der Anämie von der Kompensationsfähigkeit des blutbildenden Systems.

Die Bestimmung des freien Hgb im Plasma ist bis jetzt keine gebräuchliche Untersuchung. Gegenüber der Bestimmung im Vollblut ergeben sich vielfältige Schwierigkeiten. Der prozentuale Anteil des Hgb im Plasma ist äußerst gering, sodaß das Plasma nur wenig verdünnt werden kann. Dadurch müssen mehrere Faktoren, wie die Plasmaeigenabsorption, Trübungen und andere Farbstoffe wie Bilirubin, die bei der Hgb-Bestimmung im Vollblut keine Rolle spielen, hier berücksichtigt werden. Den Plasmafaktor umgehen wir bei unserer Methode durch Bildung eines Zwischenproduktes (s. S. 15), die Trübungen schalteten wir durch Bildung einer Extinktionsdifferenz aus (s. S. 30), den Bilirubinanteil vernachlässigten wir, nachdem die Berücksichtigung dieses Farbstoffes mit Bestimmung seines Extinktionskoeffizienten in plasmatischer Lösung einen erheblichen experimentellen Arbeitsaufwand gefordert hätte. Wir wählten eine Methodik, die eine Vernachlässigung von Bilirubin zuläßt (s. S. 18). Alle Bestimmungen des freien Hgb im Plasma beruhen auf der Messung eines bestimmten Hämoglobin-Derivates, in das möglichst alle nebeneinander vorliegenden Hämoglobin-Derivate, wie Oxyhämoglobin, reduziertes Hämoglobin, Sulfhämoglobin, Methämoglobin usw. übergeführt werden. Die bekanntesten und am häufigsten angewandten Methoden sind die Oxyhämoglobinmethode nach SCHWERD und die Benzidinmethode in mehreren Abwandlungen, z. B. nach CREDITOR. Wir übernahmen diese Methoden nicht, da sie für den Routinebetrieb recht aufwendig sind und einige wesentliche Fehlerquellen einschließen. Die Oxyhämoglobinmethode nach SCHWERD ist bei ikterischen Seren nicht geeignet, da die Messungen in einem Spektralbereich vorgenommen werden, in dessen Nähe die Absorption von Bilirubin sein Maximum aufweist. Außerdem werden mehrere Pigmente, die nach der Freisetzung des Hgb aus den Erythrozyten entstehen, nicht miterfaßt wie z. B. red. Hgb und Methämalbumin, das sich bei einer Hgb-Konzentration über 100 mg % bildet. Auch bei der Benzidinmethode, die recht zeitaufwendig ist

und bei der eine Reihe von Reagentien in den verschiedensten Konzentrationen benötigt werden, wird beim Auftreten von Methämalbumin die Extinktion wesentlich verfälscht. Auch andere Methoden, wie die Oxyhämoglobinmethode nach SHINOWARA, die Cyanmethämoglobinmethode (in Abwandlung für das Plasma-Hgb) und die Pyridinhämochromogenmethode sind entweder zu aufwendig, zu ungenau oder erfassen wesentliche Pigmente nicht. Am geeignetsten von den genannten Methoden wäre noch die Cyanmethämoglobinmethode in einer Abwandlung für Plasma-Hgb, z. B. nach FLEISCH.

Wir wählten die Globin-Hämochromogenmethode kombiniert mit der Hämatinmethode und hielten uns im wesentlichen an die Methode von HUNTER, GROVE-RASMUSSEN und SOUTTER. Die wesentlichen Vorteile dieser Methodik sind, daß sie einfach zu handhaben ist und nur wenige Reagentien benötigt werden, daß nur bei dieser Methode über die Hämatinbildung, für die kein neues Reagens notwendig ist, die Plasmaeigenabsorption berücksichtigt wird, daß die wesentlichen Hämoglobinderivate wie Oxyhämoglobin, reduziertes Hämoglobin, Sulfhämoglobin und Methämalbumin gut in Hämochromogen übergeführt werden, daß Hämochromogen ein steiles Absorptionsmaximum aufweist, das Maximum der Absorption nach 10 Minuten auftritt und über 2 Stunden stabil bleibt. Außerdem kann Bilirubin am ehesten bei dieser Methode vernachlässigt werden (s. S. 18). Ein Ungenauigkeitsfaktor tritt bei einer Hgb-Konzentration über 100 mg % auf, dadurch daß Albuminhämochromogen eine um 20 % höhere Absorptionsspitze zeigt als Hämochromogen. Diese Grenze wurde jedoch bei unseren Versuchsreihen chronisch verlaufender Krankheiten nicht überschritten. Als Nachteil kann betrachtet werden, daß der Extinktionskoeffizient für wässrige und plasmatische Lösungen nicht gleich ist und für jedes Verdünnungsverhältnis plasmatischer Lösungen neu bestimmt werden muß. Bei unserem Verdünnungsverhältnis 1 : 4 erhält man jedoch meßbare Extinktionen von 0 - 140 mg % Hgb.

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Normalwerte des Plasma-Hämoglobins angegeben. Die neueren Bestimmungen und Versuchsergebnisse tendieren zu laufend niedrigeren Werten, was durch die Verfeinerungen der Methoden und der Meßtechnik bedingt ist. Der niedrigste Wert wird von HANKS et al. im Bereich zwischen 0,160 und 0,580 mg % angegeben, während noch FLINK und WATSON und auch FLEISCH einen Normalwert bis 7,5 mg % fanden. Wir möchten betonen, daß es nicht unsere Absicht war, einen Absolutwert zu finden, sondern daß wir unsere Hauptaufgabe darin sahen, mittels einer einfachen und für Routinezwecke geeigneten Methodik, die trotzdem den Anforderungen auf Genauigkeit entspricht, einen brauchbaren Vergleichswert für pathologische Seren zu finden, was uns nach zahlreichen Umwegen und Experimenten auch gelungen ist.

Wir bestimmten den Hgb-Gehalt des Plasmas bei 44 gesunden Personen, davon 25 Frauen und 19 Männern. Ein signifikanter Unterschied fand sich zwischen Frauen und Männern nicht, sodaß wir auf eine Unterscheidung verzichteten. Unsere Normalwerte streuten in einem Bereich zwischen 1,091 mg % und 4,367 mg %. Der rechnerische Mittelwert lag bei 2,701. Der Vertrauensbereich lag mit 22,7 % zwischen 2,501 und 2,901, sodaß eine statistische Auswertung nicht möglich war. Wir zweifeln nicht an der Genauigkeit unserer Methodik, wir glauben vielmehr, daß es sich bei der Streuung der Plasma-Hgb-Werte um eine physiologische Variationsbreite handelt. Bei der Wahl der Krankheitsgruppen entschieden wir uns für Autoaggressionskrankheiten, maligne Tumoren und chronische Infekte. Die Autoaggressionskrankheiten umfaßten die primär chronische Polyarthrit, die chronische Hepatitis, die chronische Glomerulonephritis, sowie einen Fall von Sklerodermie und Kälteagglutinationskrankheit. Die malignen Tumoren unterteilten wir in Carcinome und Sarkome, in Hämoblastosen und proliferierende Prozesse des lymphoretikulären Systems. In die Gruppe der chronischen Infekte nahmen wir die chron. Pyelonephritis und die chron. Cholangitis auf.

Wir untersuchten insgesamt 88 Plasmen und fanden bei 43 Plasmen einen erhöhten Hgb-Gehalt, das sind 48,86 %. Unser höchster Wert lag bei 29,110 mg %, das entspricht dem etwa 7-fachen der oberen Grenze unserer Normalwerte. Wir fanden diesen Wert bei einer chronischen lymphatischen Leukämie, den nächsthöchsten Wert mit 22,565 mg % ebenfalls bei einer chronischen lymphatischen Leukämie, dann folgten eine chronische aggressive Hepatitis mit 18,801 mg %, eine chronische Glomerulonephritis mit 16,985 mg %, ein Morbus Hodgkin und ein Bronchialcarcinom mit 14,315 mg %, ab 12,617 mg % erhielten wir jeweils mehrere Werte. In welcher unserer drei Gruppen bzw. deren Untergruppen prozentual die meisten pathologischen Plasma-Hgb-Werte liegen, läßt sich bei der Ungleichheit der Glieder nicht definitiv sagen. Wir wählten u. a. nach der Häufigkeit der stationären Fälle und beschränkten uns vorerst auf die Autoaggressionskrankheiten und malignen Tumoren, die wir interessehalber auf chronische Infekte erweiterten. Vergleicht man die Gruppe der Autoaggressionskrankheiten (37 Fälle) mit der Gruppe der malignen Tumoren (35 Fälle) so zeigen die Autoaggressionskrankheiten wesentlich mehr pathologische Werte, nämlich 56,75 % gegenüber 37,14 %. In der kleineren Gruppe der chronischen Infekte (16 Fälle) finden sich prozentual etwa gleichviel pathologische Werte wie bei den Autoaggressionskrankheiten, nämlich 56,25 %.

Unser besonderes Interesse galt den Autoaggressionskrankheiten, einem Gebiet mit noch vielen ungelösten Problemen. Im Rahmen einer Autoaggression kann es sekundär zu einer Autoimmunisierung gegen Erythrozyten kommen, andererseits kann sich eine autoimmunologische hämolytische Anämie einstellen, ohne daß eine Autoaggression gegenüber anderen körpereigenen Substanzen festzustellen ist. Der Nachweis von Autoantikörpern gegen Erythrozyten wird in der Regel mit dem direkten oder indirekten Coombstest oder in neuerer Zeit verfeinert mit dem Antiglobulinkonsumptionstest nach STEFFEN erbracht. Bei akuten Fällen sind die serologischen Reaktionen oft negativ, auch

lassen sich bei manchen sicher erworbenen hämolytischen Anämien, wie z. B. bei der chronischen lymphatischen Leukämie, nie Antikörper nachweisen. Die Kriterien der Autoaggression sind somit schwer festzulegen. Wann kann man von Autoaggression sprechen, wenn uns die serologischen Nachweise im Stich lassen? Ein Hinweis kann die Erhöhung des Hgb im Plasma sein. Nicht geklärt ist auch die Ursache für eine autoimmunologische Formation, ihr zeitliches Auftreten im Laufe einer Erkrankung scheint sehr unterschiedlich zu sein. In diesem Zusammenhang erscheint uns ein Fall besonders bemerkenswert. Im Rahmen der Bestimmung unserer Normalwerte erhielten wir bei einem Pfleger des Kreiskrankenhauses Rothalmünster einen Plasma-Hgb-Gehalt von 12,375 mg % trotz mehrmaliger Bestimmung und ohne daß ein Anhalt für eine organische Erkrankung vorlag. Ungefähr zwei Wochen später wurden wir auf diesen Fall erneut aufmerksam, nachdem er mit einer akuten Glomerulonephritis stationär lag und einen AST von 900 ASE und eine Proteinurie von 1,7 ‰ Esbach bot. Wir glauben, daß in diesem Fall bei unserer Bestimmung des Plasma-Hgb-Gehaltes bereits immunologische Phänomene noch vor der klinischen Manifestation der Erkrankung vorlagen.

Ist bei einer Autoaggressionskrankheit das Plasma-Hgb erhöht, so dürfte es sich um eine autoimmunologische hämolytische Anämie handeln, wenn auch andere Kriterien oder Nachweise fehlen. Möglicherweise besteht auch bei den hämolytischen Anämien bei chronischen Infekten und auch bei den Tumoranämien eine autoimmunologische Komponente. Sicher überschneiden sich hier mehrere Mechanismen, wie toxische Schädigung der Erythrozyten oder des Knochenmarks mit Bildung von minderwertigen Erythrozyten, Stimulierung des RES mit gesteigerter Phagozytose, lokale Blutungen usw.

Interessant im Rahmen dieser Arbeit wären Vergleichsbestimmungen wie BKS, Bilirubin, Elektrophorese und osmotische

Resistenzbestimmung. Wir übernahmen aus den Kurven nachträglich bekannte Werte und ordneten sie tabellarisch ein. Eine direkte Beziehung bzw. eine Parallele zum Plasma-Hgb konnten wir bei keiner dieser Bestimmungen feststellen. Allerdings muß gesagt werden, daß die Vergleichswerte zum Teil nicht zur selben Zeit bestimmt wurden und nicht sämtlich in jedem Falle vorlagen. Diesen Vergleichsbestimmungen müßte eine neue Versuchsreihe unterzogen werden. Von Interesse wäre auch eine Verlaufsbeobachtung der Krankheitsbilder mit eindeutig pathologischem Plasma-Hgb-Gehalt und normalem Plasma-Hgb-Gehalt derselben Gruppe. Es bleibt dahin gestellt, ob das Auftreten einer hämolytischen Anämie im Rahmen dieser Erkrankungen eine prognostische Aussage ermöglicht, wie sie z. B. bei der chronischen lymphatischen Leukämie als prognostisch ungünstig bekannt ist. In einer weiteren Versuchsreihe könnten Krankheitsgruppen wie Allergien und akute Infektionskrankheiten auf ihren Plasma-Hgb-Gehalt untersucht werden, der bei Allergien wohl weitaus höhere Werte erreichen kann. Unsere Hauptaufgabe bestand in der Ausarbeitung einer geeigneten Methodik.

IX. Zusammenfassung

=====

Wir bestimmten den Gehalt des freien Hämoglobins im Plasma bei 44 Gesunden und 88 Fällen 3 verschiedener Krankheitsgruppen. Gegenüber der Bestimmung des Hämoglobins im Vollblut tauchen bei der Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma durch den sehr niederen prozentualen Anteil neue Schwierigkeiten auf (s. S. 12 ff). Es wird eine viel größere Genauigkeit verlangt. Die Grundvoraussetzung für eine exakte Bestimmung ist die Vermeidung einer artifiziellen Hämolyse (s. S. 33).

Wir wählten die Hämochromogen-Hämatin-Methode am Spektralphotometer und hielten uns im wesentlichen an die Methode von HUNTER, GROVE-RASMUSSEN und SOUTTER in einer Abwandlung nach FLEISCH. Nach Überprüfung auf ihre Genauigkeit und Zuverlässigkeit fanden wir sie von den in der Literatur erwähnten Methoden für den Routinebetrieb am geeignetsten. Ein wesentlicher Vorteil dieser Methode ist neben ihrer einfachen Handhabung die Miterfassung von Methämalbumin, das sich bei einem Plasma-Hgb-Gehalt über 100 mg bildet, die Möglichkeit zur Ausschaltung des Plasmafaktors und die nur geringe Beeinflussung von Bilirubin, das physiologisch und bei Hämolyse in erhöhtem Maße als Zwischenprodukt vorliegt (s. S. 15 ff).

Die Bestimmung des freien Hämoglobins im Plasma ist eine Bereicherung in der Feststellung einer Hämolyse und kann bei akut und massiv auftretenden hämolytischen Prozessen, wie im Rahmen eines allergischen oder toxischen Geschehens, der früheste und möglicherweise lebensrettende Nachweis sein, wenn andere Nachweise und Kriterien noch fehlen. Andererseits bietet sich die Möglichkeit, auch latente Hämolysen aufzudecken.

In der Literatur werden sehr unterschiedliche Normalwerte

angegeben. Es konnte nicht unser Bestreben sein, einen Absolutwert zu finden, vielmehr sahen wir unsere Aufgabe darin, einen geeigneten Vergleichswert für unsere Untersuchungsgruppen zu erhalten.

Unsere Normalwerte streuten in einem Bereich zwischen 1,091 mg % und 4,367 mg % Hgb, lagen damit im Bereich der von HAM, sowie auch von BING und BAKER angegebenen Normalwerte und unter den von FLINK und WATSON und auch von FLEISCH angegebenen Werten bis 7,5 mg %. Durch die große Streubreite der physiologischen Werte war eine variationsstatistische Erfassung nicht möglich. Wir setzten die obere Grenze der Normalwerte mit 4,367 mg % Hgb fest.

Unsere Untersuchungsgruppen umfaßten Autoaggressionskrankheiten, maligne Tumoren und chronische Infekte mit Hervorhebung der Autoaggressionskrankheiten. Wir fanden bei diesen chronisch oder latent verlaufenden hämolytischen Prozessen dieser Krankheitsgruppen erhöhte Plasma-Hgb-Werte bis 29,110 mg %. Bei den Autoaggressionskrankheiten zeigten von 37 Fällen 56,75 % erhöhte Plasma-Hgb-Werte, bei den malignen Tumoren von 35 Fällen 37,14 % und bei der kleineren Gruppe der chronischen Infekte von 16 Fällen 56,25 %.

Ob das Auftreten einer Hämolyse im Rahmen dieser Erkrankungen eine prognostische Aussage ermöglicht, konnten wir bei fehlender Verlaufsbeobachtung nicht feststellen. Eine Erhöhung des freien Hämoglobins im Plasma kann bei unseren Untersuchungsgruppen durch verschiedene Mechanismen bedingt sein. Eine autoimmunologische hämolytische Anämie dürfte sicher bei den Autoaggressionskrankheiten vorliegen, bei den malignen Tumoren und chronischen Infekten spielt sie mehr oder weniger eine nicht unwichtige Rolle.

X. L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s
=====

- ALLISON, A.C., REES, W.ap : The Binding of Hemoglobin by
Plasma Proteins (Haptoglobins)
Brit. Med. I. 2 (1957)
- BEICKERT, A. : Autoimmunolog. Komplikationen
bei neoplast. Erkrankungen
Blut, 5,6 (1959/60)
- BERLIN, R. : Syndrom der verkürzten Lebenszeit
der Erythrozyten
Acta Med. Scan. 952, Suppl. 1
(1951)
- BETKE, K. : Die peroxydat. Aktivität des roten
Blutfarbstoffes
Biochem. Zeitschrift 321 : 271
- 291 (1951)
- BETKE, K., SAVELSBERG, W. : Stufenphotometrische Hgb-Bestimmung
mittels Cyanmethämoglobin
Biochem. Zeitschr. 320 : 431 - 439
(1950)
- BING, F.C. : I. Biol. Chem. 95, 387 (1952)
- BING, F.C., BAKER, R.W. : Modifikation der Benzidinmethode
I. Biol. Chem. 92, 589 (1931)
- De BOROVICZENY, Ch.G. : Hemoglobincyanide Standard Solutions
Bibl. Haemat. Fasc. 18, 21 und 24
(1965)
- CHIAMORI, N., HENRY, R.I., GOLUB, O.I. : Some Aspects of Serum
Bilirubin Determination
Clin. Chim. Acta 6, 1 (1961)
- CHI - CHIN LIANG : The Formation of Complexes between
Hemoglobins and Plasma Proteins in
a Variety of Animals
Biochem. I. 66 : 522 (1957)
- CHILDERS, D.M., BARGER, I.D. : Über Hgb-Bestimmung bei der Diff.
575 und 560 nm
Amer. I. Clin. Pathol. 29, 546
(1958)
- COCKRELL, I.V., NAUMANN, H.N. : Surg. Forum Proc. 42. Congr.
Amer. Coll. Surg. 7, 105 (1956)
- CREDITOR, C. : Hemoglobin by Benzidine Reaction
I. of Lab. Med. Vol. 41 (1953)

- CROSBY, W.H., FURTH, W. : Experience with Hemoglobin Standard
Blood 11, 380 (1956)
- CROSBY, W.H., DAMASHEK, W. : I. Lab. Clin. Med. 38 (1951)
- DIEZ-EWALD, M., LAYRISSE, M. : Mechanismus of Hemolyses in
Iron Deficiency Anemia.
Blood, Dez. 1968
- DRABKIN, D.L. : Spectrophotometric Studies
I. Biol. Chem. 185 : 231 - 245 (1950)
- FLEISCH, G. : Autoimmunolog. Vorgänge beim
Rheumatismus
Zeitsch. f. die ges. Inn. Med.
und ihre Grenzgeb. 8 (1969)
- FLEISCH, H. : Mesure de l' hemolyse par la
détermination dans le plasma de
l' hemoglobine, la méthémoglobine
et leurs dérivés
Helv. Med. Acta 27 : 228 (1960)
- FLINK, E.B., WATSON, C.I. : A Method for the Quantitative
Determination of Hemoglobin and
Related Heme Pigments in Feces,
Urine and Blood Plasma
I. Biol. Chem. 146 : 171 (1942)
- FLOOD, F.T., MANDEL, E.E., OWINGS, R.H., FEDERSPIEL, C.F. :
Newer Standards in Hemoglobinometry
I. Lab. & Clin. Med. 43 : 847 - 904
(1954)
- GARBY, L., NOYES, W.D. : Kinetic Properties of the Plasma
Hgb-Pool
I. Clin. Invest. 38, 1479 (1959)
- GOETZE, E. : Einrichtung und Methoden des klin.
Laboratoriums
Fischer, Jena (1959)
- HALLMANN, L. : Klin. Chemie und Mikroskopie
Thieme, Stuttgart (1966)
- HANKS, G.E., CASSEL, M., RAY, R.N., CHAPLIN, H. jr. :
Further Modification of the Benzi-
dine-Method for Measurement of
Hemoglobin in Plasma
I. Lab. Clin. Med. 56 : 486 (1960)
- HANKS, G.E., CHAPLIN, H. jr. : Hemoglobin Concentration of
Circulating Plasma
Feed. Proceed. 18, 479 (1959)

- HARBOE, M. : Scand. I. Clin. Lab. Invest.
11, 66 (1959)
- HEILMEYER, L. : Mediz. Spektrophotometrie
Fischer, Jena (1933)
- HEILMEYER, L. : Pathophysiologie, Fischer, Stuttgart (1959)
- HEILMEYER, L. : Meilensteine der Anämieforschung
Freiburger Universitätsreden NF 33 (1962)
- HENNIG, N. : Klin. Laboratoriumsdiagnostik
Urban & Schwarzenberg, München (1959)
- HENRY, R.I., M.D. : Clinical Chemistry: Principles and
Technics
Harper & Row, New York (1965)
- HINELINE, A. : Standard Method of Clin. Chemistry
2, 49 Academic, Press New York (1958)
- HINSBERG-MERTEN : Chem. Bestimmungsmethoden im klin.
Laboratorium
Urban & Schwarzenberg (1952)
- HUNTER, F.T.M., GROVE-RASMUSSEN, SOUTTER, L. :
Amer. I. Clin. Pathol. 20, 429 (1950)
- KÖHLER, W. : Immunolog. Probleme bei rheumat.
Fieber und bei PCP
Zeitsch. f. die ges. Inn. Medizin
und ihre Grenzg., Heft 9 (1969)
- KORTÜM, G. : Kolorimetrie, Photometrie und
Spektrometrie
Springer, Berlin (1962)
- LATHERM, W., WORLEY, W.E. : The Distribution of Extracorp. Hgb
in Circulating Plasma
I. Clin. Invest. 38, 474 and 652 (1959)
- LAWKOWITZ, W. : Differentialdiagnose hämatologischer
Erkrankungen
Thieme, Stuttgart (1965)
- LEMBERG und LEGGE : Hematin Compounds and Bile Pigments
Interscience, New York/London (1949)
- MATTENHEIM, H. : Mikromethoden für das klin.-chem. und
biochem. Laboratorium
De Gruyter, Berlin (1966)
- MONTEGNANI, C.A. : Quantitative Determination of Hemo-
globin in Plasma and Serum; Spektro-
photometric Methods
Arch. Sc. Biol. 37 : 90 - 95 (1953)

- PORTER, G.A. : I. Lab. Clin. Med. 60, 339 (1962)
- PRIBILLA, W. : Über Einteilung der Anämien
Deutsches Ärzteblatt 6, 321 (1969)
- REIN, H., SCHNEIDER, M. : Physiologie des Menschen
Springer, Berlin (1971)
- RENGER, F. : Immunolog. Probleme bei Leber-
erkrankungen
Zeitsch. f. die ges. Inn. Med.
und ihre Grenzg., Heft 8 (1969)
- RESSLER, N., NELSON, N.A. : Verwendung eines künstl. Standards
Hgb-Bestimmung als Oxyhämoglobin und Cyanmethämoglobin
Arztl. Lab. (1959/60)
- SCHNEEWEISS, U. : Zur Krebsimmunologie
Zeitsch. f. die ges. Inn. Med. und
ihre Grenzg., Heft 7 und 8 (1969)
- SCHWERD, W. : Der rote Blutfarbstoff und seine
wichtigsten Derivate
Schmidt-Römhild, Lübeck (1962)
- SHINOWARA, G. : Spektrophotometrische Studien
Amer. J. of Clin. Patholog.
24 : 696 - 710 (1954)
- STEFFEN, C. : Allg. und exper. Immunologie und
Immunpathologie
Thieme, Stuttgart (1968)
- STRANDBERG, O. : Anemia in Rheumatoid Arthritis
Acta Med. Scand. 454 (1966)
- WU, H. : Eine Modifikation der Benzidin-
Methode
I. Biochem. 2, 189 (1922)

Herrn Professor Dr. G. Landes, Ärztlicher Direktor
des Städtischen Krankenhauses Landshut, danke ich
für die Überlassung des Themas.

L e b e n s l a u f

Am 1.4.1940 wurde ich als zweites Kind des Zollbetriebsassistenten Franz Wiesner und seiner Ehefrau Elsa, geb. Henschel, in Trautenau (Sudetenland) geboren.

Von 1946 bis 1953 besuchte ich die Volksschule in Unterneukirchen, Kreis Altötting. 1960 legte ich am Deutschen Gymnasium in München-Pasing die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1960/61 begann ich an der Universität München das Studium der Medizin. 1962 bestand ich die naturwissenschaftliche und 1964 die ärztliche Vorprüfung. Im Frühjahr 1967 beendete ich das Studium der Medizin mit dem Staatsexamen.

Von April bis Dezember 1967 war ich als Medizinalassistentin auf der Medizinischen Abteilung des Städt. Krankenhauses Landshut tätig, wo ich meine Doktorarbeit begann. Von Januar bis Dezember 1968 bekam ich meine chirurgische und gynäkologische Ausbildung im Kreis Krankenhaus Altötting. Von Januar 1969 bis Ende Januar 1971 arbeitete ich als Stationsärztin auf der Medizinischen Abteilung im Kreis Krankenhaus Rotthalmünster. Anschließend war ich im Kinderkrankenhaus Steinhöring beschäftigt. Seit Juli 1971 bin ich in der Kurklinik Johannesbad in Bad Füssing unter Leitung von Priv. Doz. Dr. Haan tätig, wo ich bis Ende des Jahres 1971 bleiben werde. Im Anschluß daran habe ich mich im Evangelischen Krankenhaus in Gelsenkirchen verpflichtet, wo ich den Facharzt für Innere Medizin anstrebe.

